



HAL
open science

Couplage covalent de protéines au peptidoglycane chez la γ -protéobactérie *Dickeya dadantii*: étude d'une protéine du système de sécrétion de type II, OutB

Xavier Nicolai

► To cite this version:

Xavier Nicolai. Couplage covalent de protéines au peptidoglycane chez la γ -protéobactérie *Dickeya dadantii*: étude d'une protéine du système de sécrétion de type II, OutB. Microbiologie et Parasitologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2023. Français. NNT : 2023LYO10312 . tel-04952545

HAL Id: tel-04952545

<https://theses.hal.science/tel-04952545v1>

Submitted on 17 Feb 2025

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° 341
Evolution, Ecosystème, Microbiologie, Modélisation**

Discipline : Microbiologie

Soutenue publiquement le 20/12/2023, par :
Xavier Nicolai

**Couplage covalent de protéines au
peptidoglycane chez la γ -protéobactérie
Dickeya dadantii : étude d'une protéine
du système de sécrétion de type II,
OutB**

Devant le jury composé de :

Mme WISNIEWSKI-DYE Florence	Professeure des Universités, UCBL1	Présidente
Mme PY Béatrice	Directrice de Recherche CNRS	Rapporteure
Mme MORLOT Cécile	Directrice de Recherche CNRS	Rapporteure
Mme LALOUX Géraldine	Professeure Associée	Rapporteure
M. BALLUT Lionel	Maître de Conférences, UCBL1	Examineur
M. ARTHUR Michel	Directeur de Recherches INSERM	Examineur
M. SHEVCHIK Vladimir	Directeur de Recherches CNRS	Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de travaux de recherche, Dr Vladimir SHEVCHIK. Vous m'avez accueilli et fait confiance depuis le début de mes études en master. Je me suis formé à la recherche à vos côtés, et vous avez permis à cette thèse de voir le jour. Mille merci pour m'avoir formé tout au long de ces années passées au MAP. Je vous souhaite encore beaucoup de plaisir et d'enthousiasme lié à la découverte de protéines couplées au peptidoglycane, avec l'aide d'étudiants, ou en solo, avec toute la liberté que permettent le cerveau et l'imagination d'un chercheur. Je vous souhaite de fructueuses collaborations pour la suite de ces travaux de recherche, encore merci !

Je remercie tous les chercheurs du MAP qui m'ont encouragé dans la poursuite d'un doctorat. Je souhaite également remercier en particulier les enseignants qui m'ont suivi tout au long de mes études : Pr Florence WISNIEWSKI-DYE, responsable du master Microbiologie à l'Université Claude Bernard Lyon 1, Dr Jacques MAURY responsable de la Licence de Biochimie et Biologie moléculaire, et Mme Magali MARIANI, ingénieure au laboratoire de l'Université de Corse, avec qui j'ai réalisé mon premier stage de biologie. Mes remerciements vont également à Mme Aurélie DENIS qui m'a contagieusement transmis sa passion pour la biologie dès la première année de classe préparatoire BCPST.

Je remercie Mme Yucheng LIANG et le Dr Michel ARTHUR pour leur collaboration et leur contribution à ce travail. Ce fut un plaisir de partager mes résultats de thèse et de constater qu'ils pouvaient faire écho en dehors du laboratoire MAP.

Mes remerciements s'adressent également aux membres de mon comité de thèse : Dr Pedro DA SILVA qui a, de plus, mis à disposition l'enzyme PGRP indispensable à ces travaux de recherche, Dr Xavier CHARPENTIER, Dr Christophe GRANGEASSE et Dr Benoît COURNOYER.

Je remercie sincèrement les membres du jury ayant accepté de participer à l'évaluation de cette thèse de doctorat : Dr Géraldine LALOUX, Dr Cécile MORLOT, Dr Béatrice PY, Dr Michel ARTHUR, Dr Lionel BALLUT et Pr Florence WISNIEWSKI-DYE.

Le doctorat m'a beaucoup appris, tant sur le plan professionnel que sur le plan personnel. En guise de bilan de fin de doctorat, je conclurai que je m'y suis avant tout confronté à mes propres limites. La thèse demande un fin dosage entre discipline et créativité : le premier, pour avancer efficacement, le second, pour élargir sa perspective et ne pas épuiser ses ressources sur une seule piste de recherche. Tout est une question d'équilibre, et heureusement qu'il existe un filet de sécurité, et toute une équipe pour nous soutenir dans le processus !

Passons maintenant aux remerciements pour les membres des équipes du MAP : MTSB, CRP, SMAL et FungiPath. Durant ces années de doctorat, j'aurai fait de belles rencontres qui m'auront profondément marqué.

Tout d'abord, je remercie Mme Florence RUAUDEL, qui était technicienne au moment de ma venue au laboratoire, et qui est maintenant promue ingénieure. Tu m'as permis de prendre mes

marques durant les premiers mois au laboratoire et tu as supervisé mes premières manipulations de stage avec grande bienveillance, pour cela un grand merci.

Je salue Melvin RENAULT, arrivé de la Criée de Marseille au premier jour de mon stage en Master 2. Si je devais garder en tête un objet pour me souvenir de toi, ce serait une clé à molette. Si vous lisez ceci et que vous avez besoin d'un ingénieur d'étude et d'un réparateur, je vous recommande chaleureusement, M. Melvin RENAULT. Il déteste le métal qui grince, et tape sur tout ce qui est cassé (ce qui permet instantanément de le réparer).

Merci à Typhaine BRUAL, doctorante au laboratoire qui aura soutenu sa thèse 20 jours avant moi. Nous nous sommes côtoyés en première année de Master, et c'est en fin de thèse que nos chemins se sépareront. Tu auras mis à profit ses connaissances en microbiologie pour monter la mini-brasserie artisanale et éphémère du MAP, brillamment appelée « MAP'tite mousse » ! En souvenir, j'emporte ton rire résonnant dans les couloirs du laboratoire (en plus de celui d'Erwan).

Je remercie à Julie BALTENNECK, ingénieure au laboratoire et amie, que je connais également depuis le Master, et pour qui, tout objet mignon suscite un vif intérêt. Je te souhaite beaucoup de bonnes choses pour la suite de ta carrière, et une activité qui éponge ton âme créative.

Un grand merci à Bastien LE DEROUT, technicien au laboratoire, qui m'a joyeusement accompagné à la paillasse durant 1 année et demie. Tu as été témoin du mode 'roue-libre' caractéristique des vendredis après-midi. Je peux t'assurer que même si je ne t'ai jamais accompagné lors de tes voyages en Thaïlande, j'en garde un souvenir inoubliable.

Comment ne pas mentionner Céline BORDE, Diana LE BERRE, Elsa DEL VAL, Mélanie CRUMIERE, Glen CALVAR, Antonio CALIO, Antonio FRANDI, Théophile GAULTIER, Matthieu BLANDENET, docteurs diplômés au MAP. Merci aux « jeunes du MAP », techniciens, étudiants en thèse, secrétaires et post-doctorants de CRP et de FungiPath Sara MOUTACHARRIF, Clara BLONDE, Amandine M'SAKNI, Lilian CLOAREC, Zineddine TOUAM, Adrien HAMANDJIAN, Maïwenn PINEAU, Krystal RATAFIKA, Margot SARACCO, Thomas BACCHETTA, Fahis LARBI, avec qui j'ai partagé des moments de convivialité. Merci pour leur soutien, et merci pour leur immense contribution à la cohésion au sein de l'unité et à son atmosphère chaleureuse !

Je n'oublie évidemment pas les étudiants en stage, membres éphémères de la vie des laboratoires, qui marquent pourtant les esprits : Jules GUILLEMAUD, Quentin DUBOIS et Noémie CLAVEYROLLES tous désormais en thèse. Merci à Théo MATHIEU, qui a finalement appris à dire bonjour ;), et à Mathilde CECCHI tous deux étudiants de l'INSA ayant préparé le concours IGEM 2022.

Je remercie particulièrement les étudiants que j'ai côtoyés de plus près encore : Gaëlle SAGON, étudiante de M1, dont une partie des expériences de mutagenèse de Lpp réalisées avec brio est publiée dans ce manuscrit. Merci à Vincent BERTHAUD, qui s'est creusé la tête sur le sujet des protéines couplées au peptidoglycane pendant son stage de M2, et qui a fait preuve de beaucoup de pertinence dans ses remarques et dans ses propositions. J'adresse également un merci particulier à Mathilde BASNIER-HERMIDA, stagiaire en échange, qui a diffusé quelques rayons de soleil d'Espagne lors de son passage au laboratoire.

Merci au duo composé de Mme Sylvie REVERCHON et M. William NASSER, à Mme Florence HOMMAIS, Mme Fete El Zahar HAICHAR, M. Sam MEYER, Mme Cécile RIBOT, M. Yoann LOUIS, Mme Mylène HUGONI, M. Phil OGER pour leurs conseils et les moments conviviaux partagés aux pique-niques d'unité.

Je remercie également l'équipe pédagogique de Génétique microbienne, en particulier M. Erwan GUEGUEN, M. Mathias CHOQUER, Mme Nathalie POUSSEREAU, M. François-Xavier GILLET, M. Christophe BRUEL, ainsi que Mme Patricia LUIS, pour m'avoir permis de m'initier à l'enseignement lors de cours de TP de L2 et de L3.

Je remercie Mme Sandrine CHARLES, directrice de l'école doctorale E2M2, pour les échanges fructueux que nous avons eus avec les représentants-doctorants E2M2, mais aussi pour les balles de tennis échangées sur les courts.

Je remercie « l'équipe du 3^{ème} », l'équipe SMAL : Mme Marion BARRY, M. Alexandre SOULARD, M. Julien DEFAUD. Merci pour les conversations riches en points de vue et en enseignements, et merci à M. Marc LEMAIRE qui sera finalement parvenu à m'initier au karaté. Ce fut un réel plaisir de partager des moments avec vous. Merci pour votre accueil chaleureux lors des repas de midi, particulièrement en hiver, dans les froids couloirs du Lwoff.

Merci aux secrétaires du laboratoire, Mme Martine BACCOU, Mme Salima KOUISSA, M. Fahis LARBI et Mme Audrey MARCHETTI pour les moments conviviaux partagés, leur bonne humeur et les conversations sur des sujets variés que nous avons pu avoir : régates, concerts, soirées Gipsy, vie de famille. Un merci particulier à M. Marie-André LAVITAL, adjoint technique au laboratoire, pour m'avoir quotidiennement partagé ta bonne humeur et ta philosophie inspirée de la vie des îles. Merci pour les incroyables boissons exotiques que tu prépares lors des rassemblements du MAP. Je sais que la plante zz et la pousse de café dans mon bureau seront entre de bonnes mains lors de mon départ.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans mentionner Dr Agnès RODRIGUE et Dr Nicole COTTE-PATTAT pour leurs conseils durant ma thèse, au Dr Yvan RAHBE, pour ses conseils et les concerts de jazz. Merci à Mme Géraldine EFFANTIN et à Mme Véronique UTZINGER qui ont été témoin de chacune de mes nombreuses irruptions dans leur bureau, pour subtiliser discrètement des parts de gâteau. Vous contribuez au sentiment « familial » de l'équipe MTSB en partageant le quotidien de vos enfants respectifs. Merci à M. Guy CONDEMINE pour avoir également contribué à ma formation aux côtés de Vladimir. Merci pour les invitations aux chorales et pour les dégustations de vin au château de Juliéas.

Pour clôturer ces remerciements, je voudrais adresser ma gratitude à ma famille. En premier lieu à mon frère, Robin NICOLAI, au caractère et à la personnalité complémentaires aux miens. Le lien fraternel qui nous unit est une bénédiction. Enfin, je remercierai mes parents : ma mère, Mirna ANTONIOS, et mon père, Jean-Jacques NICOLAI, auxquels je dois mon éducation. Vous m'avez toujours soutenu dans mes choix. La vie s'est perpétuée à travers vous. Je vous aime.

Liste des abréviations

AT : acide téichoïque

Bactéries à Gram-négatif : bactéries à coloration Gram-négatif

Bactéries à Gram-positif : bactéries à coloration Gram-positif

BAM : β -barrel assembly machinery, système d'assemblage des protéines en tonneau- β dans la ME

CL : de cardiolipine

CTE : extension C-terminale d'OutB

GlcNac : N-acétyl-D-glucosamine

HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance

HR : homology region

Ldt : L,D-transpeptidase

Lol : Localization of lipoprotein, système d'adressage des lipoprotéines à la membrane externe

Lpp : lipoprotéine de Braun

LPS : lipopolysaccharides

mDAP : acide diaminopimélique

ME : membrane externe

MI : membrane interne

MS : spectrométrie de masse

MurNac : acide N-acétylmuramique

OMP : outer membrane porine, protéine en tonneau- β

PBP : penicillin binding protien, ou D,D-transpeptidase

PE : phosphatidyléthanolamine (PE)

PEI : Pic d'éluion

PG : peptidoglycane

PGBD : peptidoglycan binding domain, domaine de liaison non-covalent au PG

PGL : phospholipides phosphatidylglycérol anioniques

PGRP : amidase de *Sitophilus zeamais*

PKS : polycétide synthase

SDS : sodium dodécyl sulfate

SEDS : shape, elongation, division and sporulation

T2SS : système de sécrétion de type II

WGA : wheat germ agglutinine, agglutinine de germe de blé se lie à la N-acétyl-D-glucosamine

Liste des tableaux et des illustrations

Introduction Bibliographique

Tableau 1.	Épaisseur du peptidoglycane des bactéries à Gram-positif mesurée par différents auteurs.....	p.2
Tableau 2.	Épaisseur du peptidoglycane des bactéries à Gram-négatif mesurée par différents auteurs.	p.2

Matériel et Méthodes

Tableau 3.	Souches utilisées dans ce travail.	p.82
Tableau 4.	Oligonucléotides utilisés pour l'amplification des gènes <i>ldt</i> chez <i>D. dadantii</i> et <i>E. coli</i>	p.82
Tableau 5.	Oligonucléotides utilisés pour la construction des versions d'OutB.	p.82
Tableau 6.	Oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse dirigée du motif C-terminal de Lpp.	p.84
Tableau 7.	Oligonucléotides utilisés pour la construction de la fusion BlaM-OutB.	p.84
Tableau 8.	Oligonucléotides utilisés lors de la mutagenèse de PaeX.	p.84
Tableau 9.	Plasmides utilisés dans ce travail.	p.86

Introduction Bibliographique

Figure 1.	Facteurs de stress et leurs conséquences sur l'enveloppe bactérienne.	p.1
Figure 2.	Les trois structures archétypales des enveloppes bactériennes.	p.3
Figure 3.	Structure des lipides et du lipopolysaccharide (LPS) présents dans la membrane externe (ME) des bactéries didermes à LPS.	p.4
Figure 4.	Structure et organisation du PG d' <i>E. coli</i>	p.5
Figure 5.	Origine et évolution de la membrane externe (ME) selon Gupta, Cavalier-Smith et Tocheva.	p.10
Figure 6.	Représentation des quatre systèmes d'attachement de la membrane externe (ME) au peptidoglycane (PG).	p.11
Figure 7.	Distribution des principaux systèmes d'attachement connus de la membrane externe (ME) placée sur une phylogénie de référence des bactéries.	p.12
Figure 8.	La lipoprotéine de Braun (Lpp) sert à l'ancrage de la membrane externe.	p.13
Figure 9.	Systèmes SecYEG et Tat chez <i>E. coli</i>	p.14
Figure 10.	Machineries cellulaires responsables de la biogenèse de la membrane externe.	p.15
Figure 11.	Systèmes de réponse aux stress de l'enveloppe bactérienne.	p.18
Figure 12.	Structure chimique des β -lactamines.	p.21
Figure 13.	Modèles d'organisation du PG dans les parois bactériennes.	p.22
Figure 14.	Peptidoglycane de <i>Bacillus subtilis</i> observé en AFM.	p.23
Figure 15.	Régulation de la synthèse de PG.	p.24
Figure 16.	Modèles temporels et spatiaux de l'organisation des complexes de synthèse du PG.	p.25
Figure 17.	Modification des saccharides de la chaîne de glycanes.	p.28
Figure 18.	Diversité des couplages entre les peptides-tiges du PG.	p.35
Figure 19.	Action des enzymes lytiques sur les liaisons du PG.	p.38

Figure 20. A.	Mécanisme de transpeptidation réalisé par les PBPs.	p.41
Figure 20. B.	Mécanisme de transpeptidation réalisé par les Ldts.	p.47
Figure 20. C.	Couplage de Lpp au PG par les Ldts.	p.50
Figure 21.	Séquences et domaines des 5 Ldts et de l'endopeptidase DpaA (LdtF) d' <i>E. coli</i>	p.44
Figure 22.	Alignement du site actif YkuD de quelques Ldts de bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif.	p.53
Figure 23.	Comparaison structurale des Ldts de <i>S. Typhi</i> , <i>E. coli</i> et <i>E. faecium</i>	p.54
Figure 24.	Structure du complexe Pal avec le précurseur de PG, le lipide I.	p.57
Figure 25.	Des protéines en tonneau- β et une lipoprotéine sont attachées de manière covalente au PG chez des protéobactéries dépourvues de Lpp.	p.66
Figure 26.	Organisation du système de sécrétion de type II (T2SS).	p.73
Figure 27.	Visualisation du système de sécrétion de type II (T2SS) par cryo-EM chez <i>Legionella pneumophila</i>	p.76
Figure 28.	Alignement des protéines GspB de <i>Dickeya</i> , <i>Pectobacterium</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Klebsiella</i> et <i>Vibrio</i>	p.77
Figure 29.	OutB est requise pour la virulence de <i>D. dadantii</i>	p.78

Résultats

Figure 30.	A. Modèle AlphaFold d'OutB. B. L'extrémité de la CTE d'OutB est spécifique aux bactéries du genre <i>Dickeya</i>	p.89
Figure 31.	Mise en évidence du couplage de Lpp au PG chez <i>D. dadantii</i>	p.90
Figure 32.	Analyse du couplage d'OutB au PG chez <i>D. dadantii</i>	p.91
Figure 33.	Représentation schématique des versions d'OutB utilisées lors de ces travaux.	p.92
Figure 34.	La fusion de la protéine rapportrice BlaM (β -lactamase périplasmique) à l'extension C-terminale d'OutB permet son attachement covalent au PG.	p.93
Figure 35.	Séquence des fusions entre Lpp et l'extrémité C-terminale d'OutB (Lpp:OutB), et des versions allongée et raccourcie de Lpp.	p.94
Figure 36.	Evaluation du couplage au PG des fusions Lpp:OutB au PG de <i>D. dadantii</i>	p.95
Figure 37.	Evaluation du couplage des versions Lpp+21 et Lpp Δ 21 au PG de <i>D. dadantii</i>	p.96
Figure 38.	Mutagenèse dirigée de la Lpp-box de Lpp de <i>D. dadantii</i>	p.97
Figure 39.	Mutagenèse dirigée de la Lpp-box de Lpp de <i>D. dadantii</i>	p.98
Figure 40.	Analyse du couplage des versions Lpp au PG chez <i>D. dadantii</i>	p.99
Figure 41.	Analyse du couplage des versions Lpp portant l'extrémité C-terminale des protéines potentiellement couplées au PG.	p.100
Figure 42.	Analyse du couplage de PaeX au PG chez <i>D. dadantii</i>	p.101
Figure 43.	Test de résistance au SDS des souches <i>D. dadantii</i> mutées d'un ou de plusieurs gènes <i>ldt</i>	p.102
Figure 44.	Analyse du couplage de Lpp dans les souches de <i>D. dadantii</i> mutées d'un ou de plusieurs gènes <i>ldt</i>	p.103
Figure 45.	L'expression de <i>ldt84</i> sur plasmide pGEM-T provoque un défaut de croissance de <i>D. dadantii</i> en présence d'ampicilline.	p.104

Figure 46.	Analyse du couplage de Lpp par les <i>Ldt</i> de <i>D. dadantii</i> et d' <i>E. coli</i>	p.105
Figure 47.	Test de sécrétion de pectinases des souches de <i>D. dadantii</i> mutées d'un ou de plusieurs gènes <i>Ldt</i> ou du gène <i>lpp</i>	p.106
Figure 48.	Profils de HPLC-MS/MS de l'analyse du PG de <i>D. dadantii</i> sauvage (A), du mutant <i>Ldt84</i> (exprimant <i>Ldt03</i>) (B) et du mutant <i>Ldt03</i> (exprimant <i>Ldt84</i>) (C).	p.107
Figure 49.	Analyse du couplage d'OutB au PG chez les mutants de <i>D. dadantii</i> dépourvus d'un ou de plusieurs gènes <i>Ldt</i>	p.108
Figure 50.	Observation en microscopie électronique des souches de <i>D. dadantii</i> mutées d'un ou de plusieurs gènes <i>Ldt</i> et de <i>lpp</i> en coloration négative.	p.109
Figure 51.	Ultrastructure des souches de <i>D. dadantii</i> délétées d'un ou de plusieurs gènes <i>Ldt</i> et de <i>lpp</i> observées au MET.	p.110
Figure 52.	Observation en microscopie électronique de la souche <i>lpp</i> de <i>D. dadantii</i> complétée avec le vecteur pGEM-T vide (Ve), ou portant les gènes <i>lpp wt</i> , <i>lpp+21</i> ou <i>lppΔ21</i> en coloration négative.	p.111
Figure	Cinétique de digestion du PG de <i>D. dadantii</i> par le lysozyme et PGRP.	
Annexe 1.	p.111
Figure	Arbre phylogénétique des <i>Ldt</i> d' <i>E. coli</i> et de <i>D. dadantii</i>	
Annexe 2.	p.111
Figure	Alignement des séquences représentatives des <i>Ldts</i> de <i>D. dadantii</i> , d' <i>E. coli</i> et de <i>K. pneumoniae</i> (4LZH, homologue de <i>LdtB</i> (YbiS)).	p.111
Annexe 3.	Alignement des séquences représentatives des <i>Ldts</i> de <i>D. dadantii</i> , d' <i>E. coli</i> et de <i>K. pneumoniae</i> (4LZH, homologue de <i>LdtB</i> (YbiS)).	p.111
Annexe 4.	Alignement des séquences représentatives des <i>Ldts</i> de <i>D. dadantii</i> , d' <i>E. coli</i> et de <i>K. pneumoniae</i> (4LZH, homologue de <i>LdtB</i> (YbiS)).	p.111
Annexe 5.	Alignement Muscle <i>Ldts</i> de <i>D. dadantii</i> , d' <i>E. coli</i> et de <i>K. pneumoniae</i> (4LZH, homologue de <i>LdtB</i> (YbiS)).	p.111

Table des matières

Remerciements _____

Liste des abréviations _____

Liste des tableaux et illustrations _____

Table des matières _____

Introduction bibliographique _____ **1**

I) L'enveloppe bactérienne _____ **2**

1) Coloration de Gram	2
2) Les trois structures archétypales des enveloppes bactériennes	2
3) Les composants de l'enveloppe bactérienne.....	4
4) Les membranes des bactéries didermes délimitent le périplasma.....	9
5) Un pseudo-périplasma entre la MI et le PG des bactéries monodermes ?	9
6) Origines de la didermie et de la monodermie	10
7) Systèmes de transport de protéines à travers l'enveloppe	12
8) Biogenèse de la ME.....	16
9) Chaperonnes périplasmique et homéostasie du périplasma	18
10) La synthèse et l'expression de ces protéines chaperonnes sont régulées par les systèmes de détection de stress.....	19

II) Structure du saccule, ou l'architecture du PG _____ **22**

1) Modèles d'organisation du PG, structure tridimensionnelle	22
2) Propriétés mécaniques et topographie du saccule	24
3) Synthèse du PG	25
4) Méthodes d'analyse de la composition du PG	27
5) Diversité des chaînes de glycanes	28
6) Diversité des peptides-tiges	33
7) Degré de réticulation et nature du couplage du PG.....	36
8) Recyclage et édition du PG au cours du cycle cellulaire	37

III) La transpeptidation est la dernière étape de la synthèse du PG _____ **41**

1) Les D,D-transpeptidases, ou PBP's	42
2) Les L,D-transpeptidases, ou Ldts	45

IV) L'attachement non covalent chez les bactéries à Gram-positif et les bactéries à Gram-négatif **55**

1) Les domaines d'attachement non-covalent au PG (PG-binding domains, PGBD).....	55
2) Systèmes d'attachement de la ME par des protéines possédant des domaines de liaison non covalent au PG chez les bactéries à Gram-négatif.....	58

V) L'attachement covalent des protéines chez les bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif _____

_____	60
1) L'attachement covalent des protéines par les sortases chez les bactéries à Gram-positif	60
2) L'attachement covalent des protéines par les L,D-transpeptidases chez les bactéries à Gram-négatif.....	62

VI) <i>Dickeya dadantii</i>, comme un modèle d'étude du couplage covalent des protéines au PG	71
1) <i>Dickeya dadantii</i> , une γ -protéobactérie phytopathogène	71
2) Le T2SS.....	74
Objectifs de la thèse	81
Matériel et méthodes	83
Résultats	89
I) L'attachement covalent d'OutB au PG de <i>D. dadantii</i>	89
1) OutB est attachée de manière covalente au PG de <i>D. dadantii</i>	89
2) La Lpp-box d'OutB, une séquence de liaison « universelle » au PG chez <i>D. dadantii</i> ?	94
3) La taille du périplasme impacte-t-elle la capacité d'OutB à se lier au PG ?.....	96
II) Résidus C-terminaux de la Lpp de <i>D. dadantii</i> indispensables à son couplage au PG	97
1) Mutagenèse dirigée des six résidus C-terminaux de Lpp de <i>D. dadantii</i>	97
2) Mutagenèse dirigée permettant à Lpp de mimer l'extrémité C-terminale de protéines candidates	98
III) Evaluation du couplage covalent des protéines candidates identifiées	99
IV) L,D-transpeptidases de <i>D. dadantii</i> impliquées dans le couplage covalent d'OutB et de Lpp au PG	100
1) Identification des Ldts responsables du couplage de Lpp chez <i>D. dadantii</i>	101
2) L'expression de Ldt84 est toxique dans certaines conditions	102
3) Expression hétérologue des Ldt d' <i>E. coli</i> chez le mutant <i>ldt03/ldt84</i> de <i>D. dadantii</i>	103
4) Test de stabilité de l'enveloppe.....	105
5) Spécificité enzymatique des Ldt03 et Ldt84	106
6) Identification des Ldts de <i>D. dadantii</i> responsables du couplage d'OutB au PG	108
V) Visualisation de l'enveloppe des mutants <i>lpp</i> et <i>ldt</i> de <i>D. dadantii</i> par microscopie électronique	109
Publication	112
Discussion	120
Conclusion	128
Références bibliographiques	
Poster	
Résumé	
Abstract	

a.	Catégorie	Stress	Effet sur l'enveloppe
a.	Stress environnementaux	Diminution de la température	Diminution du taux de biosynthèse Diminution du taux de repliement des protéines Diminution de la fluidité membranaire
		Augmentation de la température	Dénaturation de la structure des protéines Perturbation des voies de biosynthèse Augmentation de la fluidité membranaire
		Modification du pH	Perturbation du repliement des protéines Perturbation des réactions chimiques
		Hypo-osmolarité	Entrée d'eau à l'intérieur de la cellule Diminution de la concentration des solutés intracellulaires Diminution de la tension membranaire
		Stress oxydatifs	Domages oxydatifs au niveau des protéines Domages oxydatifs au niveau des membranes Mauvais repliement des protéines
		Carences nutritionnelles	Réduction des biosynthèses
b.	Composés toxiques et antimicrobiens	Métaux	Domages oxydatifs Perturbation de la localisation des métaux intrinsèques
		Antibiotiques ciblant l'enveloppe	Perturbation de la structure de la cible (ex. le peptidoglycane)
		Antibiotiques inhibant la traduction	Perturbation de la sécrétion des protéines par le translocon Sec
		Peptides antimicrobiens	Perturbation des membranes
		Sels biliaires et détergents	Solubilisation des membranes
c.	Stress intrinsèques	Stress traductionnels	Défauts de repliement des protéines
		Surexpression de protéines	Défauts de sécrétions Perturbation des membranes
		Mutations	Perturbation de la biosynthèse

Figure 1. Facteurs de stress et leurs conséquences sur l'enveloppe bactérienne. Les stress sont représentés dans les colonnes de gauche et leurs effets respectifs, dans la colonne de droite. **a.** Les stress environnementaux tels que les chocs thermiques, la variation de pH, les stress oxydatif et le stress nutritionnels impactent majoritairement la biosynthèse et le repliement des protéines. Les chocs osmotiques et thermiques influent quant à eux sur la tension et la fluidité membranaire. **b.** Les composés toxiques, tels que les métaux causent des stress oxydatifs. Les détergents déstabilisent les membranes de l'enveloppe bactérienne, et les antibiotiques ciblent de nombreux processus cellulaire ; entre autres, la réplication de l'ADN, la transcription des ARNs, la traduction de protéines et la synthèse de la paroi bactérienne. **c.** Les stress de l'enveloppe peuvent également être causés par des facteurs intrinsèques à la bactérie. Par exemple, certaines mutations, ou la surexpression de protéines, ou bien les défauts de traduction impactent la formation et l'intégrité de l'enveloppe. D'après Mitchell et Silhavy 2019.

Introduction bibliographique

La vision traditionnelle et les connaissances scientifiques divisent fondamentalement le monde du vivant en deux groupes. D'une part, les organismes eucaryotes, généralement visibles à l'œil nu, sont représentés par les végétaux, les animaux et les champignons. Ces organismes sont majoritairement mono- et pluricellulaires. Leurs cellules mesurent 10 à 100 μm en moyenne, sont capables de différenciation et possèdent de nombreuses organelles. Entre autres, elles possèdent un noyau, une paroi, un cytosquelette, des mitochondries, un réticulum endoplasmique et un appareil de Golgi (Koonin 2010). Pour ces raisons, les eucaryotes sont considérés comme des « organismes supérieurs » (Salton 1994). D'autre part, les organismes procaryotes (archées et bactéries) sont quant à eux majoritairement unicellulaires et leurs cellules se distinguent par leur taille de l'ordre du micromètre, c'est pourquoi ils sont appelés micro-organismes. Leur structure est en apparence simple : elles ne possèdent ni de vrai noyau, ni d'organelles, à l'exception des thylakoïdes chez les cyanobactéries (Koonin 2010). L'existence des micro-organismes a été révélée grâce aux premiers microscopes il y a près de trois cents ans. En 1674, Antoni van Leeuwenhoek confectionne des lentilles de microscope permettant d'atteindre un grossissement jusqu'alors inégalé, estimé entre $\times 250$ et $\times 500$ (Haidar 2016). Grâce à son invention, il observe des organismes microscopiques contenus dans des fluides biologiques, tels que le sang, la salive, l'eau et le liquide séminal. Antoni van Leeuwenhoek réalise entre autres les premières descriptions de globules rouges, de spermatozoïdes, de protozoaires ciliés et de bactéries. Il fait part de ses observations à l'académie de sciences Royal Society of London (Rupert Hall 1989). Celles-ci constituent les prémices de l'étude du microcosme biologique, et notamment de la bactériologie. Lors de ses analyses en microscopie, Van Leeuwenhoek avait clairement distingué que certaines bactéries possédaient des formes particulières. Certaines apparaissaient comme des microorganismes sphériques, appelées coques ou *cocci*. D'autres étaient de forme cylindrique à pôles hémisphériques ; celles dont l'axe est droit sont appelées bacilles, tandis que celles dont l'axe est incurvé sont appelées vibrions, alors que celles qui possèdent un axe hélicoïdal sont les spirochètes ou les tréponèmes. Van Leeuwenhoek avait suspecté que la diversité des morphologies des bactéries observées indiquait qu'elles possédaient une structure de surface rigide permettant le maintien de leur forme, sans que celle-ci ne puisse jamais être observée à l'époque. Malgré l'observation liminaire d'une telle diversité, les scientifiques qui lui ont succédé ont longtemps considéré les bactéries comme des sortes de sacs inertes, estimant que leur taille était incompatible avec une possible différenciation morphologique ou structurale (Salton 1994).

Il aura fallu attendre les progrès en microscopie électronique pour observer l'« enveloppe bactérienne », la structure responsable de la forme des bactéries. L'enveloppe bactérienne est définie comme une structure multicouche protégeant le cytoplasme : elle est composée de la ou des membranes, ainsi que d'une paroi majoritairement constituée de la couche rigide de peptidoglycane (PG). L'enveloppe assure diverses fonctions : elle est indispensable au maintien de la forme de la bactérie et de l'homéostasie cellulaire, aux fonctions d'échange avec le milieu extérieur, et à la protection de la cellule face à son environnement hostile (Fig. 1). Elle est indispensable à la survie de la bactérie, qui doit faire face à de multiples stress environnementaux tels que les chocs osmotiques

Tableau 1. Épaisseur du peptidoglycane des bactéries à Gram-positif mesurée par différents auteurs.

Espèce bactérienne	Mesure	Méthode	Référence
<i>Bacillus subtilis</i>	30 – 40 nm	Cryo-EM	Graham & Beveridge 1994
	19 ± 4.3 nm	Cryo-TEM	Matias & Beveridge 2005
	53 ± 13 nm	AFM	Hayhurst <i>et al.</i> 2008
	34 ± 10 nm (hydraté)	AFM	Pasquina-Lemonche <i>et al.</i> 2020
	9 ± 1 nm (déshydraté)		
<i>Staphylococcus aureus</i>	33.6 ± 4 nm	Cryo-TEM	Matias & Beveridge 2006
	36 ± 5.3 nm (hydraté)	AFM	Pasquina-Lemonche <i>et al.</i> 2020
	17 ± 2 nm (déshydraté)		
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	7-9 nm	AFM	Wheeler <i>et al.</i> 2011 Saar Dover <i>et al.</i> 2015
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	30.3 ± 5.7 nm (CW)	Cryo-EM	Marienfield <i>et al.</i> 1997
	33.1 ± 4.0 nm (CW, substituted freezing)		
	15.2 ± 4.1 nm (PG)		
	18.5 ± 3.1 nm (PG, substituted freezing)		
<i>Mycobacterium thermoresistibile, phlei, fortuitum et aurum</i>	23.5 ± 2.7 nm	Cryo-EM	Paul & Beveridge 1992

* la variabilité des mesures s'explique soit par la précision des techniques utilisées, soit par la méthode de préparation de l'échantillon. CW : épaisseur de la paroi (PG + acides téichoïques) ; PG : épaisseur de la paroi dépourvue d'acides téichoïques (PG)

Tableau 2. Épaisseur du peptidoglycane des bactéries à Gram-négatif mesurée par différents auteurs.

Espèce bactérienne	Mesure	Méthode	Référence
<i>Escherichia coli</i>	2.5 nm	SANS	Labischinski <i>et al.</i> 1991
	3.0 nm (sacculé déshydraté)	AFM	Yao <i>et al.</i> 1999
	6.0 nm (sacculé hydraté)		
	6.35 nm ± 0.53 nm	Cryo-TEM	Matias <i>et al.</i> 2003
	2,0 nm ± 0.3 nm	AFM	Turner <i>et al.</i> 2013
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3.0 nm	AFM	Yao <i>et al.</i> 1999
	2.41 nm ± 0.54 nm	Cryo-TEM	Matias <i>et al.</i> 2003

ou thermiques, les changements de pH, ou la présence de molécules toxiques et d'antibiotiques (Mueller et Levin 2020) (Fig. 1). Historiquement, la coloration de Gram a constitué la première technique permettant de mettre en évidence la diversité des enveloppes.

I) L'enveloppe bactérienne

1) Coloration de Gram

La technique développée par le biologiste danois Hans Christian Gram en 1884 a mis en évidence la diversité de la composition des parois dans le règne bactérien. Cette technique consiste à observer au microscope des bactéries fixées sur une lame de verre ayant subi des étapes successives de coloration. La lame de verre contenant les bactéries fixées est d'abord colorée au cristal violet, ou violet de gentiane, qui colore le cytoplasme de toutes les bactéries en violet (Tripathi et Sapa 2023). Ensuite, la lame est traitée avec le lugol iodo-iodure, un agent de fixation formant un complexe avec le cristal violet qui prévient l'élimination précoce de la coloration lors de l'étape suivante. Un décolorant composé des solvants acétone et éthanol est ensuite appliqué à la lame de verre. Lors de cette étape, Gram a remarqué que certaines bactéries retenaient efficacement la coloration violette : ce sont les bactéries à coloration Gram-positif ; d'autres étaient transparentes, ce sont les bactéries à coloration Gram-négatif (Tripathi et Sapa 2023). Enfin une contre-coloration à la safranine de couleur rose, colore les bactéries à Gram-négatif, en rose, tandis que la couleur violette, plus foncée, des bactéries à Gram-positif n'est pas affectée. Il faut également noter que le temps de décoloration est crucial, puisqu'une exposition prolongée au solvant décolore l'ensemble des bactéries fixées sur la lame de verre, y compris les bactéries à Gram-positif.

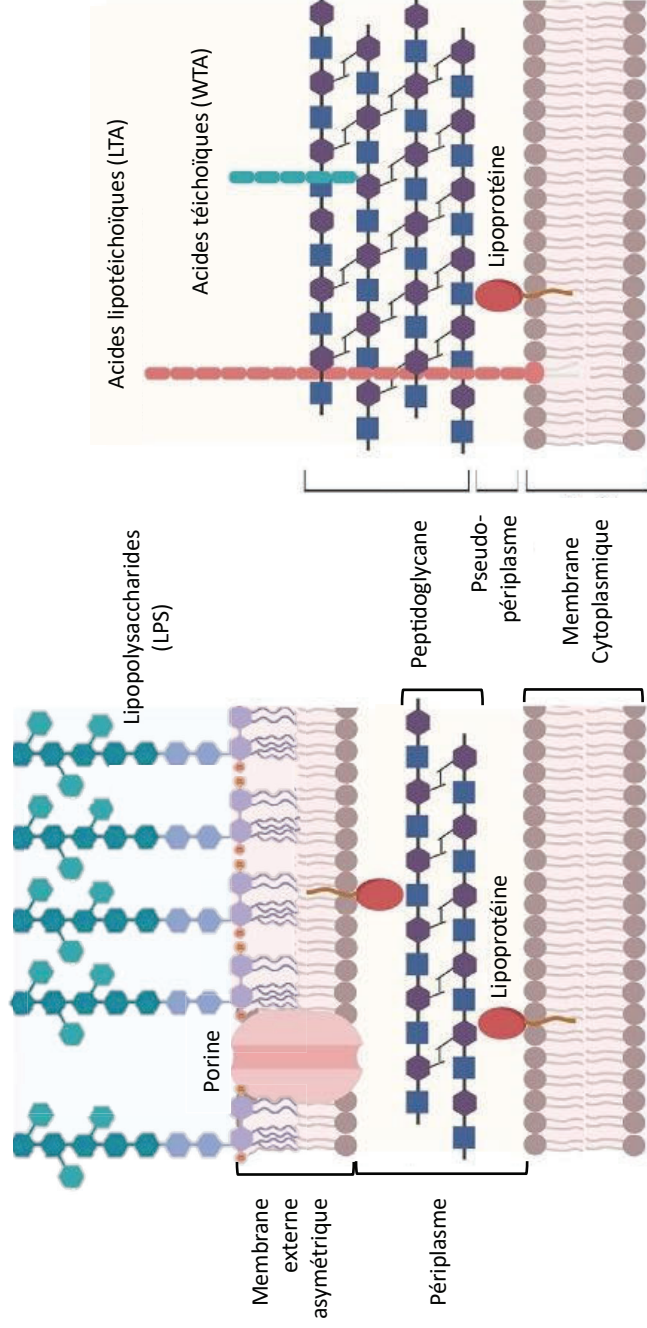
A l'issue de la coloration, les bactéries apparaissent de couleur différente à cause de l'épaisseur de leur paroi. Par exemple, une bactérie possédant une paroi épaisse (30 à 50 nm), comme *Bacillus subtilis*, retient plus efficacement la coloration au cristal violet (Tableau 1). Celle-ci apparaîtra comme positive à la coloration de Gram. En revanche, une bactérie possédant une fine couche de PG (3 à 6 nm), comme *Escherichia coli*, retient moins efficacement le cristal violet, et est négative à la coloration de Gram (Tableau 1 et 2).

2) Les trois structures archétypales des enveloppes bactériennes

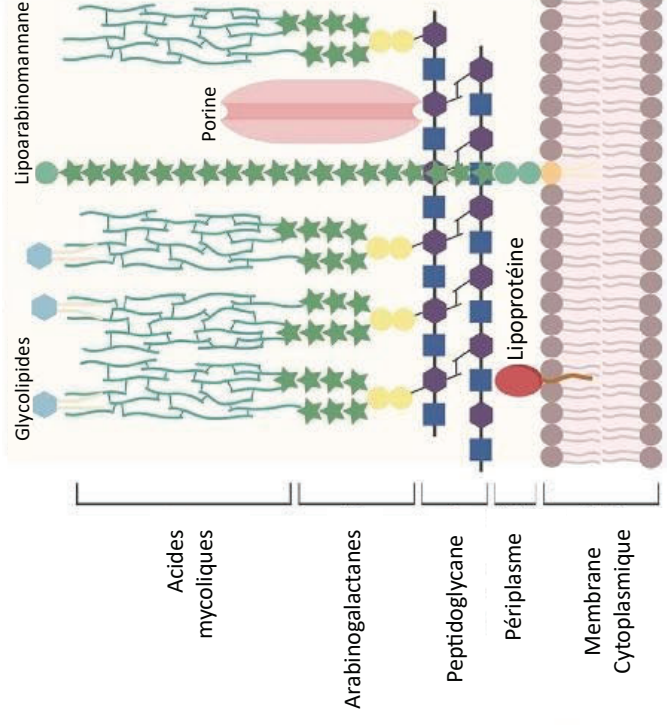
a. L'enveloppe des bactéries à Gram-positif

L'enveloppe caractéristique des bactéries à Gram-positif est composée d'une seule membrane cytoplasmique (MI) et d'une épaisse couche de PG (Tableau 1, Fig. 2). En plus du PG, la paroi des bactéries à Gram-positif est composée de polymères anioniques de surface, comme les acides téichoïques et les protéines de surface (Vollmer 2008) (Fig. 2). Les bactéries possédant cette architecture d'enveloppe sont majoritairement positives à coloration de Gram. C'est pourquoi l'enveloppe des bactéries monodermes est devenue archétypale de l'enveloppe des 'bactéries à Gram-positif' (Fig. 2). Les bactéries à Gram-positif en forme de bacilles ont été associées à *Bacillus subtilis*, une bactérie monoderme, dont l'enveloppe est représentative de la majorité des Firmicutes (Fig. 2 et

Bactéries à Gram-négatif (didermes à lipopolysaccharides)



Bactéries à Gram-positif (monodermes)



Mycobactéries

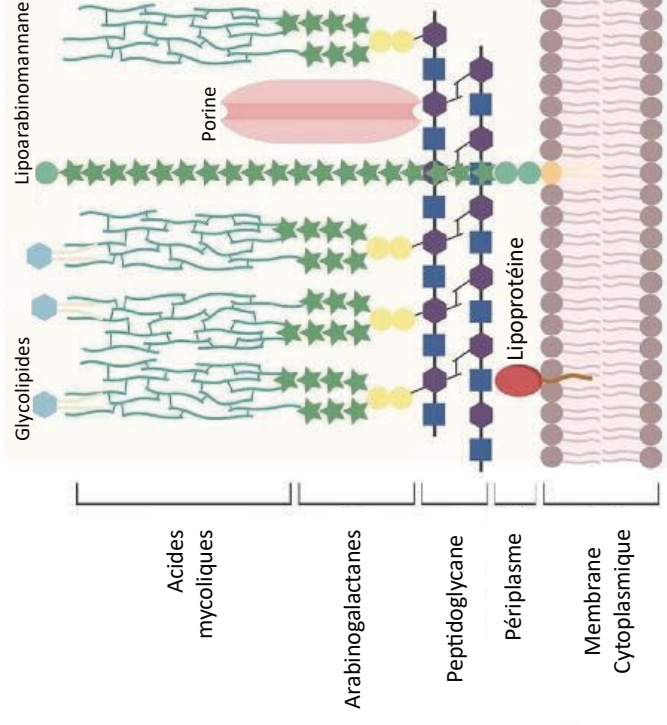


Figure 2. Les trois structures archétypales des enveloppes bactériennes. Cette illustration met en lumière les principales différences entre les trois d'enveloppes bactériennes. Toutes possèdent une membrane cytoplasmique (MI), qui est une bicouche lipidique délimitant le contenu intracellulaire du milieu extérieur. **A gauche**, l'enveloppe archétypale des bactéries à Gram – est composée de deux membranes et d'une fine couche de peptidoglycane (PG). La membrane externe (ME) est composée de deux feuillets asymétriques : sa face externe est composée de lipopolysaccharides (LPS), tandis que sa face interne est composée de glycérophospholipides. Les lipoprotéines et les protéines en tonneaux- β (OMPs) sont les deux types de protéines de la ME. Les deux membranes MI et ME délimitent un espace appelé 'périplasm', contenant une fine couche de PG (3 à 4 nm). L'enveloppe des bactéries à Gram –, également appelées 'didermes à lipopolysaccharides', est caractéristique de l'enveloppe des Gramicutes comme *E. coli*. Néanmoins, ce type d'enveloppe est également retrouvé chez trois groupes de Firmicutes : les Négativcutes, les Halanaerobiales et les Limnochordia. **Au centre**, l'enveloppe des bactéries à Gram +, ou monodermes, est composée d'une unique membrane, la MI, et d'une paroi constituée d'une épaisse couche de PG (30 à 100 nm) et d'acides téichoïques et lipotéichoïques. Un pseudo-périplasm se formerait dans l'espace situé entre la MI et la couche de PG. Ce type d'enveloppe est caractéristique des Firmicutes, dont les bactéries *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* ou encore *Streptococcus pneumoniae*. **A droite**, les Mycobactéries sont des bactéries didermes. Leur enveloppe est constituée de la MI, d'un complexe de PG surmonté d'arabinogalactanes rattachés à des acides mycoliques. Ces acides mycoliques forment une ME de composition particulière, appelée mycomembrane. D'après Porfirio *et al.* 2019.

7). Les agents pathogènes *Staphylococcus aureus* ou *Streptococcus pneumoniae* sont représentatifs des bactéries monoderme en forme de coque.

Les acides téichoïques

Les acides téichoïques (AT) sont des polymères anioniques de surface encastrés dans la couche de PG, composés de GlcNac, de ribitol et de rhamnose (Trudelle *et al.* 2022) (Fig. 2). Il existe deux sortes d'ATs : les ATs de la paroi, attachés au PG de manière covalente, et les ATs ancrés à la membrane, appelés acides lipotéichoïques (Silhavy *et al.* 2010). Ces derniers représentent 60 % de la masse totale de la paroi bactérienne et contribuent dans certains cas à son épaisseur (Silhavy *et al.* 2010). Par exemple, chez *Bacillus subtilis*, la paroi est moins épaisse lorsque la couche d'ATs est enlevée, alors que chez *Staphylococcus aureus*, l'épaisseur de la paroi reste identique avec ou sans les ATs (Matias et Beveridge 2005, 2006) (Tableau 1).

Les protéines de surface

Les protéines de surface des bactéries à Gram-positif peuvent être séparées en trois catégories : celles qui sont attachées par des liaisons ioniques ou hydrophobes, celles qui s'attachent par leur extrémité N-terminale (lipoprotéines) et celles qui s'attachent covalamment aux peptides-tige du PG par leur motif C-terminal LPxTG via des enzymes appelées sortases (Dramsi *et al.* 2008) (voir chapitre 'Sortases' p.59). Ces protéines de surface sont majoritairement impliquées dans l'adhésion de la bactérie à la cellule hôte, dans la colonisation des surfaces, et à l'évasion au système immunitaire (FISCHETTI 2019). Parmi ces protéines, on peut citer la protéine Sfb de *Streptococcus pyogenes* qui s'attache à la fibronectine (Molinari *et al.* 1997). Des enzymes constituent également des protéines de surface, comme la protéine Hyal1 de *Streptococcus pneumoniae* qui permet la dégradation de la matrice extracellulaire de l'organisme hôte (Suits *et al.* 2014).

b. L'enveloppe des bactéries à Gram-négatif

Certaines bactéries possèdent deux membranes, et sont donc appelées didermes. Dans ce cas, leur enveloppe est composée d'une MI, d'une couche de PG de faible épaisseur, et d'une membrane supplémentaire composée de lipopolysaccharides (LPS) entourant le PG, appelée membrane externe (ME) (Fig. 2, Tableau 2). Pour cette raison, les bactéries à Gram-négatif sont également appelées 'bactéries didermes à lipopolysaccharides'. Les deux membranes délimitent un espace intermembranaire appelé périplasme, qui assure la compartimentalisation de la bactérie (Fig. 2). *Escherichia coli* est la bactérie archétypale des bactéries à Gram-négatif, représentative des Protéobactéries, phylum du clade des Gracilicutes (Fig. 2 et 7).

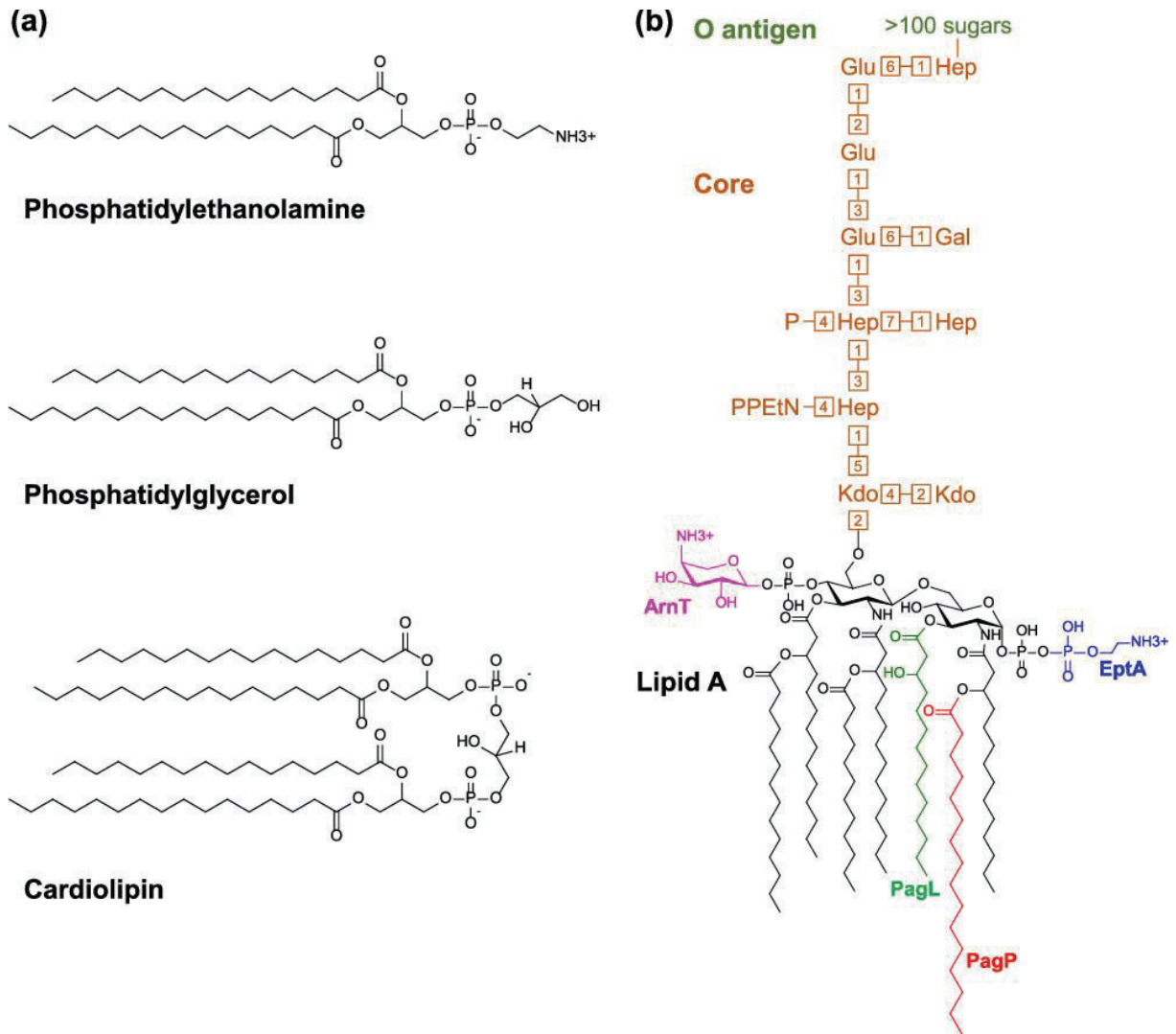


Figure 3. Structure des lipides et du lipopolysaccharide (LPS) présents dans la membrane externe (ME) des bactéries didermes à LPS. **a.** Structure des trois types de phospholipides de la ME d'*E.coli*. Cette dernière est composée de 75 % de phosphatidyléthanolamine, 20 % de phosphatidylglycérol et 5 % de cardiolipine. Les lipides majoritaires sont formés de 16 et 18 carbones, bien que la composition puisse changer en fonction des stress subis par l'enveloppe. **b.** Le LPS est formé d'une partie hydrophobe, le lipide A (en noir) et d'une partie saccharidique composée du core-oligosaccharide et de l'antigène O (en orange et en vert clair, respectivement). Les modifications possibles de la structure du LPS sont indiquées par une autre couleur. L'architecture de l'antigène O, la partie la plus variable du LPS, n'est pas représentée. Le feuillet externe de la ME est constitué d'un enchaînement de molécules de LPS. Ces molécules sont stabilisées et encore plus densément empaquetées grâce à la présence de cations bivalents Mg^{2+} entre les molécules de LPS. Les chélateurs de cations bivalents, comme l'EDTA, déstabilisent la barrière formée par le LPS à la surface de la cellule. D'après Lundstedt *et al.* 2021.

c. L'enveloppe des Mycobactéries

Les Mycobactéries, comme *Mycobacterium tuberculosis*, sont également des organismes didermes, mais la composition de leur ME diffère de celle des bactéries à Gram-négatif. Les Mycobactéries possèdent une MI, un complexe de PG-arabinogalactanes et une ME particulière d'acides mycoliques, appelée mycomembrane (Fig. 2). La coloration de Gram n'est pas pertinente pour ce groupe de bactéries, car leur enveloppe comporte à la fois les caractéristiques de bactéries à Gram-positif (une épaisse couche de PG retenant efficacement la coloration de Gram) et les caractéristiques de bactéries à Gram-négatif (une ME). Bien que les Mycobactéries soient des micro-organismes didermes, celles-ci sont positives à la coloration de Gram (Daffé et Marrakchi 2019). Ainsi, un résultat positif à la coloration de Gram ne signifie pas toujours que les bactéries possèdent une enveloppe de type 'monoderme'.

La classification des bactéries par la coloration de Gram possède donc des limites ne permettant pas de déterminer précisément l'architecture de l'enveloppe. C'est pourquoi il est plus correct d'utiliser les termes « monoderme », « diderme » ou « didermes à lipopolysaccharides » pour décrire l'enveloppe bactérienne. Néanmoins, la classification de Gram reste largement utilisée dans la littérature. C'est pourquoi, dans ce manuscrit, les bactéries didermes à lipopolysaccharides (LPS) et monodermes seront respectivement nommées bactéries à Gram-négatif et bactéries à Gram-positif.

3) Les composants de l'enveloppe bactérienne

Plus récemment, la composition des enveloppes bactérienne a été déterminée grâce aux progrès de microscopie électronique et à la spectrométrie de masse (Anderson *et al.* 2020; Khursigara *et al.* 2018) (Fig. 2). En outre, les méthodes de cytologie en microscopie électronique ont permis de mettre en évidence les structures superficielles, ou externes de la cellule. Les techniques de microscopie à balayage (MEB) ou la microscopie à force atomique (AFM) permettent une visualisation tridimensionnelle de la cellule bactérienne et de ses structures cellulaires (Reigoto *et al.* 2021; Sheng *et al.* 2023). Tandis que d'autres méthodes, comme les coupes cytologiques, les cryofractures ou la microscopie électronique à transmission (MET), permettent d'analyser les éléments intracellulaires de la bactérie (Taylor 2008; Winey *et al.* 2014). La spectrométrie de masse a permis d'analyser la composition de chaque composant de l'enveloppe.

a. La membrane cytoplasmique (MI)

La membrane cytoplasmique est une bicouche lipidique fluide qui délimite le cytoplasme du milieu extérieur. Les membranes cytoplasmiques des cellules eucaryotes et des bactéries sont majoritairement composées de glycérophospholipides d'une longueur de 16 à 18 atomes de carbone, à l'exception de la membrane monocouche des archées, composée jusqu'à 40 atomes de carbone (Caforio et Driessen 2017; Tourte *et al.* 2020). Les propriétés biochimiques des glycérophospholipides leur permettent de s'assembler spontanément sans apport d'énergie en une bicouche amphiphile : une partie hydrophobe au cœur de la bicouche et deux parties hydrophiles de part et d'autre de la bicouche. Par leurs propriétés chimiques, les glycérophospholipides forment une barrière stable

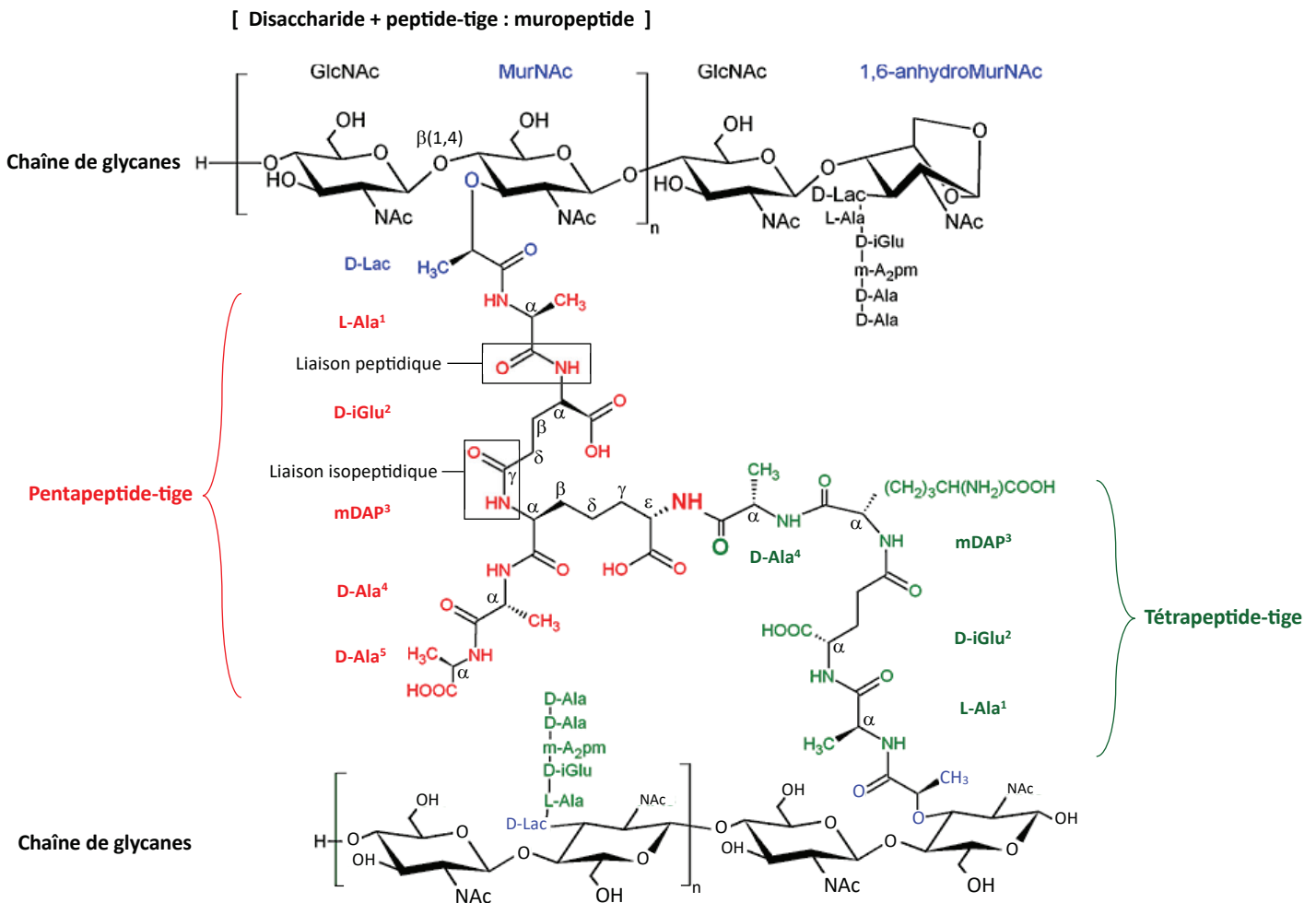


Figure 4. Structure et organisation du PG d'*E. coli*. Le PG est un polymère de chaînes de glycanes (en noir, en haut et en bas). Elles sont composées de disaccharides de N-acétylglucosamine (GlcNAc), en noir, et d'acide-N-acétylmuramique (MurNAc), en noir et bleu, reliés par des liaisons $\beta(1-4)$. La chaîne de glycanes est terminée par un résidu non-réducteur 1,6-anhydroMurNAc représenté dans la partie supérieure droite. Les chaînes de glycanes sont couplées entre elles par de courts peptides-tiges (en rouge et en vert) reliés au résidu D-lactyle en C3 du MurNAc, en bleu. L'ensemble disaccharide-peptide-tige forme le muropeptide. Les peptides-tiges néosynthétisés sont constitués de 5 acides aminés : L-Ala¹, D-iGlu², m-DAP³, D-Ala⁴, D-Ala⁵, tandis que les autres peptides-tige peuvent être constitués de 4 (en vert) ou 3 acides aminés (non représenté) en fonction du stade d'assemblage de la paroi. Ici, le groupe carbonyle du D-Ala⁴ du tétrapeptide-tige vert est couplé au groupe ϵ -amine de la chaîne latérale du m-DAP³ du pentapeptide-tige rouge (liaison D-Ala⁴ \rightarrow mDAP³, ou 4 \rightarrow 3). Ce type de liaison est effectué par les PBP, ou D,D-transpeptidases. Les atomes impliqués dans la liaison peptidique sont indiqués en gras. Les acides-aminés d'un même peptide-tige sont reliés par des liaisons peptidiques, excepté le D-iGlu² et le mDAP³, qui sont reliés par une liaison isopeptidique établie entre le carbonyle du C γ de la chaîne latérale du D-iGlu² et l'amine- α du mDAP³. Ala, alanine. Glu, acide glutamique. mDAP, acide meso-diaminopimélique. D'après Jean *et al.* 2018.

permettant de séparer deux compartiments aqueux (Alberts *et al.* 2002). Les glycérophospholipides ne sont pas les composants uniques des membranes biologiques. Celles-ci contiennent également des sphingolipides, stérols, ainsi que de nombreuses protéines qui modulent sa rigidité, sa perméabilité et lui confèrent une fonction d'échanges et de communication avec le milieu extérieur (Watson 2015). Par exemple, la MI d'*E. coli* est composée de 75 % de phosphatidyléthanolamine (PE), de 20 % de phospholipides phosphatidylglycérol anioniques (PGL) et de 5 % de cardiolipine (CL) (Rowlett *et al.* 2017) (Fig. 3). Cette composition est relativement constante au cours de différentes conditions de culture d'*E. coli* (Rowlett *et al.* 2017). Chez *B. subtilis*, la MI est composée de ~64 % de PGL, de 31 % de PE, de 3 à 6 % CL, et de 1.1 à 2.5 % de lysyl-phosphatidylglycérol (Bernat *et al.* 2016) (Fig. 3). La membrane cytoplasmique est le site majeur d'activité métabolique de la cellule bactérienne. Elle assure la respiration des bactéries aérobies comme le font les mitochondries dans les cellules eucaryotes (Saier Jr. *et Bogdanov* 2013). Elle est le site d'activités enzymatiques permettant le passage et l'absorption sélective des substrats nutritifs pour la bactérie, présents dans le milieu de croissance. À travers la membrane cytoplasmique, sont excrétées, en outre, les enzymes responsables de la synthèse des constituants de la paroi.

La membrane cytoplasmique est peu résistante aux forces exercées perpendiculairement à sa surface, du fait de sa composition et des forces de van der Waals qui la maintiennent. Par conséquent, la membrane est susceptible de rompre et d'entraîner la lyse de la cellule sous l'effet de pression osmotique (Gebicki *et James* 1960). Pour faire face à cette contrainte, une couche rigide de PG entoure la MI. En condition hyposmotique, la cellule gonfle et la MI s'étend jusqu'à rencontrer la couche de PG. La pression est alors transférée à cette couche de PG, plus rigide, qui circonscrit l'expansion physique de la membrane. En revanche, les bactéries dépourvues de PG doivent être maintenues dans un milieu isotonique afin d'éviter la lyse de la cellule (Sun *et al.* 2014).

b. Le peptidoglycane (PG), le composant majoritaire de la paroi bactérienne

Dans la littérature, des termes synonymes font référence au PG : muréine, mucopeptide et mucoComplexe. En microscopie électronique, le PG apparaît comme une structure dense aux électrons adjacente à la MI. Le PG est une macromolécule continue de 10^{10} Da en forme de filet de pêche qui entoure et protège la cellule bactérienne (Vollmer, Blanot, *et al.* 2008). Le PG est composé de chaînes de glycanes reliées entre elles par des peptides-tiges de 5 acides-aminés (Fig. 4). Les chaînes de glycanes sont composées d'une alternance de sucres N-acétylglucosamine (NAG ou GlnNac) et acide N-acétylmuramique (NAM ou MurNac) qui forment un polymère glucidique (Fig. 4). Le groupement D-lactyl en C₃ du MurNac est relié à un oligopeptide de cinq acides-aminés de composition variable selon l'espèce bactérienne considérée. Chez *E. coli*, cet oligopeptide, appelé peptide-tige, est constitué de cinq acides aminés qui s'enchaînent suivant cet ordre depuis le C₃ du MurNac : L-Ala¹, D-Glu², mDAP³, D-Ala⁴, D-Ala⁵ (Vollmer *et Seligman* 2010). L'ensemble formé par le disaccharide GlcNac-MurNac-peptide-tige est appelé le muropeptide (Fig. 4). Cette structure en apparence simple permet un assemblage d'une incroyable complexité, semblable à une structure en filet de pêche, à la fois rigide, mais flexible dû au fait que deux peptides tiges adjacents peuvent se lier de manière covalente par

l'action d'enzymes appelées transpeptidases (Fig. 4). Ce pontage covalent crée un réseau complexe de chaînes de glycanes et de peptides : le peptido-glycane.

Le PG est un composant retrouvé chez la grande majorité des bactéries. Des études précédentes suggéraient que les parasites intracellulaires comme *Mycoplasma*, *Planctomycetes* et *Chlamydia*, ainsi que les bactéries L-formes étaient dépourvues de paroi cellulaire (Joseleau-Petit *et al.* 2007; Rogers 1970). Cependant, des études plus récentes ont montré que bien que ces bactéries ne possédaient pas de saccule classique, elles portaient néanmoins un PG résiduel permettant la constriction de l'enveloppe, nécessaire à leur division (Liechti *et al.* 2014, 2016; Pilhofer *et al.* 2013; van Teeseling *et al.* 2015). En effet, la division cellulaire est indissociable de la synthèse de PG septal, puisqu'il est indispensable pour la constriction de l'enveloppe. Cette couche de PG résiduel ne remplit toutefois plus son rôle de protecteur contre les chocs osmotiques. Une preuve initiale de la présence de PG chez les *Chlamydia*, a été apportée le fait que ces bactéries étaient sensibles aux β -lactames, des antibiotiques inhibant la synthèse de PG (Tamura *et Manire* 1968). De plus, chez cette bactérie, des enzymes de synthèse du peptide-tige sont exprimées et fonctionnellement actives, comme MurC ou DapF (homologue à Murl) (Hesse *et al.* 2003; Liechti *et al.* 2018). Enfin, la croissance de *Chlamydia* en présence de sondes dipeptidiques fluorescentes s'incorporant spécifiquement dans le PG, a mis en évidence la présence de disques de PG au niveau du septum. Ces disques de PG permettent la constriction des membranes et la division cellulaire (Liechti 2021; Liechti *et al.* 2014). De même, l'analyse de génomes de *Planctomycetes* couplée aux études biochimiques et aux visualisations en cryo-EM ont permis de démontrer la présence d'une fine couche de PG chez ces bactéries (Jeske *et al.* 2015; van Teeseling *et al.* 2015). Ainsi le PG semble être un composant incontournable des bactéries.

L'action lytique du lysozyme ou l'inhibition de synthèse du PG des bactéries à Gram-négatif aboutit à la formation de sphéroplast, tandis que chez les bactéries à Gram-positif ces formes de bactéries dépourvues de paroi s'appellent les protoplastes (Nishida 2020). Les sphéroplast bénéficient de la persistance de la ME afin de mieux résister aux variations de pression osmotique (Sun *et al.* 2014), contrairement à la bicouche lipidique de la MI des protoplastes. Par ailleurs, la génération de bactéries dépourvues de paroi permet d'augmenter leur volume jusqu'à 15 μm afin d'effectuer des microinjections de substances variées, dont des chromosomes bactériens entiers qui ne peuvent pas être transférés par transformation, transduction ou conjugaison (Nishida 2020, 2023; Takahashi *et al.* 2020; Takahashi et Nishida 2022). Les formes de bactéries déficientes en paroi sont appelées formes L et peuvent être produites de manière dirigée en inhibant le gène *murE*, impliqué dans la synthèse du précurseur de PG, et en additionnant le milieu de Mg^{2+} (Leaver *et al.* 2009).

c. La membrane externe (ME), uniquement présente chez les bactéries didermes

Les avancées technologiques en microscopie ont permis de visualiser en 1964 la ME chez la bactérie à Gram négatif *Veillonella parvula* (Bladen et Mergenhagen 1964). Les analyses chimiques ont démontré par la suite que la ME ne possédait pas la même composition que la membrane cytoplasmique tant au niveau lipidique qu'au niveau protéique (Horne *et al.* 2020) (Fig. 2). En effet, la membrane cytoplasmique est traversée par des protéines de fonction variées, alors que la ME comporte uniquement des lipoprotéines et des protéines en tonneau- β (Paulowski *et al.* 2020). Trois

types de membranes externes de composition moléculaire différente ont été décrites dans la littérature. Premièrement, les membranes symétriques constituées d'une bicouche lipidique sont relativement rares et retrouvées chez la bactérie extrémophile *Deinococcus radiodurans* et la Myxobactérie *Sorangium cellulosum* (δ -proteobactérie) (Keck *et al.* 2011; von Kùgelgen *et al.* 2022; Rands *et al.* 2019). Dans ce cas, les deux feuillets de la ME sont composés d'un feuillet externe et d'un feuillet interne de glycérophospholipides, comme dans une membrane plasmique « classique ». Deuxièmement, les membranes asymétriques constituées d'un feuillet interne de phospholipides et d'un feuillet externe de lipopolysaccharides (LPS) (Paulowski *et al.* 2020) (Fig. 2 et 3). Ce type de membrane est largement répandu et archétypal de la ME des bactéries à Gram-négatif, comme *E. coli*. Cette membrane omniprésente chez les Gracilicutes (comme les Protéobactéries, les Planctomycetes, les Bacteroidetes et les Spirochètes (Witwinowski *et al.* 2022). Dans le cas de la ME à LPS, le feuillet interne de la ME est constitué des glycérophospholipides comme les phosphatidyléthanamines, les phosphatidylglycérols et les cardiolipines (Fig. 3.a), tandis que le feuillet externe est exclusivement constitué de LPS (Kamio *et* Nikaido 1976) (Fig. 3.b). Le LPS est composé du lipide A, suivi d'un noyau saccharidique et d'un oligosaccharide répété, l'antigène-O (Saini *et* Wood 2020). Le phylum des Firmicutes, l'un des plus grands phyla bactériens, regroupe une majorité de bactéries monodermes. Néanmoins, au moins trois groupes de Firmicutes appelés Négativicutes (*Veillonella parvula*), Halanaerobiales et Limnochordia possèdent une enveloppe caractéristique des didermes à lipopolysaccharides. D'ailleurs, tout comme les autres bactéries à Gram-négatif, ces Firmicutes didermes possèdent un système d'attachement de la membrane externe au PG, garantissant l'intégrité de l'enveloppe. En particulier, ces Firmicutes possèdent une porine OmpM, un équivalent fonctionnel d'OmpA et de Lpp, qui attache la ME au PG via un domaine spécialisé SLH (S-Layer Homology) (Witwinowski *et al.* 2022) (Fig. 6). Par ailleurs, les études récentes suggèrent que la ME à LPS a été ancestralement présente chez toutes les Firmicutes, mais a été perdu par la suite dans les plusieurs groupes (Antunes *et al.* 2016; Megrian *et al.* 2020; Taib *et al.* 2020). Ainsi, seuls les représentants de trois groupes de Firmicutes, notamment les Négativicutes, les Halanaerobiales et les Limnochordia possèdent une ME à LPS (Witwinowski *et al.* 2022). Enfin, il existe un troisième type de ME, retrouvé chez les Corynebactéries (un groupe d'Actinobactéries) chez lesquelles la ME est composée d'acides mycoliques (Rahlwes *et al.* 2019), il en va de même pour *Mycobacterium* (Daffé *et* Marrakchi 2019; Marrakchi *et al.* 2014) (Fig. 2). Ce sont des lipides ramifiés d'une longueur allant jusqu'à 100 atomes de carbones. La forte teneur en acides mycoliques du feuillet interne de la ME des Mycobacteriaceae lui a donné le nom de mycomembrane (Chiaradia *et al.* 2017). En plus des acides mycoliques, cette ME est aussi composée de tréhaloses et de dimycolates. Par ailleurs, la structure de l'enveloppe de *Mycobacterium tuberculosis* est formée d'un complexe PG-arabinogalactanes-acides mycoliques (feuillet interne) et d'un feuillet externe composées de lipides, lipoglycanes et de protéines (Vincent *et al.* 2018) (Fig. 2). Les premiers forment une plateforme sur laquelle est solidement attaché le PG. Les acides mycoliques sont quant à eux attachés au peptide-tige du PG par des liaisons esters (Daffé *et* Marrakchi 2019).

La membrane à lipopolysaccharides (LPS)

Les lipopolysaccharides sont les composants majoritaires du feuillet externe de la ME des bactéries à Gram-négatif. Le LPS est abondant, puisqu'environ 2×10^6 molécules de LPS recouvrent la surface de la ME chez *E. coli* (Minabe *et al.* 1994) (Fig. 3). Le LPS est composé de trois domaines structuraux : le lipide A, le core oligosaccharide et l'antigène-O (Fig. 3). Le lipide A est un disaccharide phosphorylé de glucosamine portant de multiples acides gras. Sa nature hydrophobe permet l'ancrage à la ME (Fig. 2). Il est relié au core oligosaccharide, lui-même relié à plusieurs unités oligosaccharidiques appelées antigène-O, la partie la plus variable du LPS, d'une longueur de 2 à 8 saccharides (Wang *et al.* 2010) (Fig. 3). Le LPS est considéré comme un motif moléculaire associé aux pathogènes (PAMP). Il a initialement été désigné comme « endotoxine », à cause des lésions spécifiques que peut produire l'antigène-O chez l'hôte infecté au moment de la lyse des bactéries (Sassi *et al.* 2010; Wang *et al.* 2010). Seules quelques bactéries à Gram-négatif sont capables de survivre en absence de LPS : *Neisseria meningitidis*, *Moraxella catarrhalis* et *Acinetobacter baumannii* (Kang *et al.* 2021; Simpson *et al.* 2021). Lorsque le transport de LPS à la ME est impacté, la bactérie est plus sensible aux antibiotiques et aux détergents, puisque la proportion en lipides du feuillet externe augmente sensiblement, ce qui les rend plus vulnérables à la présence de détergents (Lundstedt *et al.* 2021).

Les propriétés du LPS contribuent à l'intégrité structurale de la ME, et fait de celle-ci une barrière très sélective. Premièrement, la nature amphiphile du LPS permet d'établir une barrière perméable protégeant la cellule bactérienne des molécules du milieu extérieur (Carpenter *et al.* 2016; Nikaido 2003). En effet, le lipide A confère un caractère hydrophobe au LPS, ce qui empêche le passage de molécules hydrophiles à travers la ME, tandis que le core oligosaccharide et l'antigène-O, hydrophiles, empêchent la pénétration de molécules hydrophobes (Carpenter *et al.* 2016; Nikaido 2003). Deuxièmement, le LPS est une structure très dense car les acides gras du le lipide A comportent entre 4 et 7 insaturations, ce qui empêche la fluidité de la membrane (Nikaido 2003). De plus, la cohésion des molécules de LPS est améliorée par les interactions polyioniques établies entre les groupements phosphate du lipide A et du core oligosaccharide, et des cations magnésium (Raetz *et Whitfield* 2002). De fait, l'interaction de ces deux molécules, l'une chargée négativement et l'autre chargée positivement améliore significativement la répulsion de molécules par la ME.

La présence de LPS modifie également les propriétés mécaniques et biochimiques de la ME des bactéries à Gram-négatif en modifiant sa résistance aux contraintes physiques et en modulant la diffusion de diverses molécules. Le LPS confère une charge négative à la surface de la bactérie, ce qui modifie notamment l'équilibre de Gibbs-Donnan (diffusibilité des ions à travers la membrane). Cet équilibre est atteint lorsque les flux électriques et diffusifs de part et d'autre de la membrane se compensent (Stock *et al.* 1977). Contrairement à la membrane cytoplasmique, la membrane à LPS est capable de supporter des forces perpendiculaires à sa surface. Cela permet notamment de contenir la pression osmotique du cytoplasme (Deghelt *et al.* 2023; Rojas *et al.* 2018). Par ailleurs, la diffusibilité des composants au sein de la ME est limitée par rapport à celle de la membrane cytoplasmique, plus fluide (Hsu *et al.* 2017; Mühlradt *et al.* 1974).

En conclusion, La ME fonctionne comme une barrière semi-perméable. Elle est la première barrière physique rencontrée par les composés extérieurs comme les peptides antimicrobiens cationiques produits par de nombreux organismes, y compris les bactéries à Gram-positif (Nikaido *et Vaara* 1985).

4) Les membranes des bactéries didermes délimitent le périplasma

La membrane cytoplasmique et la ME délimitent ensemble un compartiment aqueux appelé périplasma. Chez *E. coli*, le périplasma mesure environ de 25 nm de largeur (Mandela *et al.* 2022) (Fig. 2). Du point de vue biochimique, le périplasma ménage un compartiment séparé du cytoplasme et dépourvu d'ATP, dans lequel peuvent toutefois se dérouler des réactions enzymatiques. Cette compartimentalisation cellulaire permet l'isolement et la séquestration de certaines enzymes lytiques comme les RNAses ou la phosphatase alcaline qui constituent « la première ligne de défense » de la cellule (Miller *et Salama* 2018; Silhavy *et al.* 2010). Pour ces raisons, le périplasma est considéré comme précurseur des structures lysosomales eucaryotes (De Duve *et Wattiaux* 1966). Le périplasma est également un compartiment aux propriétés physico-chimiques particulières. Les observations de diffusion de molécules fluorescentes dans le périplasma d'*E. coli* par FRAP ont montré que le périplasma est un milieu aqueux présentant une viscosité légèrement plus importante que le cytoplasme (Mullineaux *et al.* 2006). Pour cette raison, le périplasma est qualifié de « gel-like matrix ». Du point de vue physico-chimique, le pH du périplasma est équivalent à celui du milieu extérieur (Wilks *et Slonczewski* 2007). De même, le potentiel redox du périplasma approche ceux du milieu extérieur, donc « oxydant », contrairement à celui du cytoplasme qui est « réducteur ». Selon plusieurs études, le périplasma serait un environnement osmorégulé, bien que la pression osmotique exercée par le cytoplasme soit supérieure à la pression osmotique du milieu extérieur (Erickson 2017; Wilks *et Slonczewski* 2007). Le fait que la pression osmotique autour du PG et de la membrane cytoplasmique soit localement équilibrée faciliterait entre autres l'invagination du septum lors de la division cellulaire.

5) Un pseudo-périplasma entre la MI et le PG des bactéries monodermes ?

Les techniques de cryo-TEM ont révélé deux couches de paroi de densité différentes chez *B. subtilis* et *S. aureus* (Matias *et Beveridge* 2005, 2006) : la Inner Wall Zone (IWZ) de faible densité et la Outer Wall Zone (OWZ) de densité plus importante (Fig. 2). La OWZ serait la couche dense composée du PG et des acides téichoïques, tandis que la IWZ, de densité plus faible, serait un pseudo-périplasma. Erickson et ses collègues ont proposé que les acides téichoïques permettraient la mise en place d'une sorte de périplasma chez les bactéries à Gram-positif. La thèse de ces auteurs est qu'un pseudo-périplasma serait essentiel pour la synthèse et le remodelage du PG chez les bactéries à Gram-positif. En effet, il pourrait assurer un espacement adéquat entre la MI et le PG pour permettre le bon fonctionnement d'enzymes de synthèse du PG, comme c'est le cas chez les bactéries à Gram-négatif (Erickson 2021). De plus, les acides téichoïques permettraient de maintenir la pression osmotique dans ce compartiment situé proche de la membrane cytoplasmique. Oku et collègues ont en effet montré

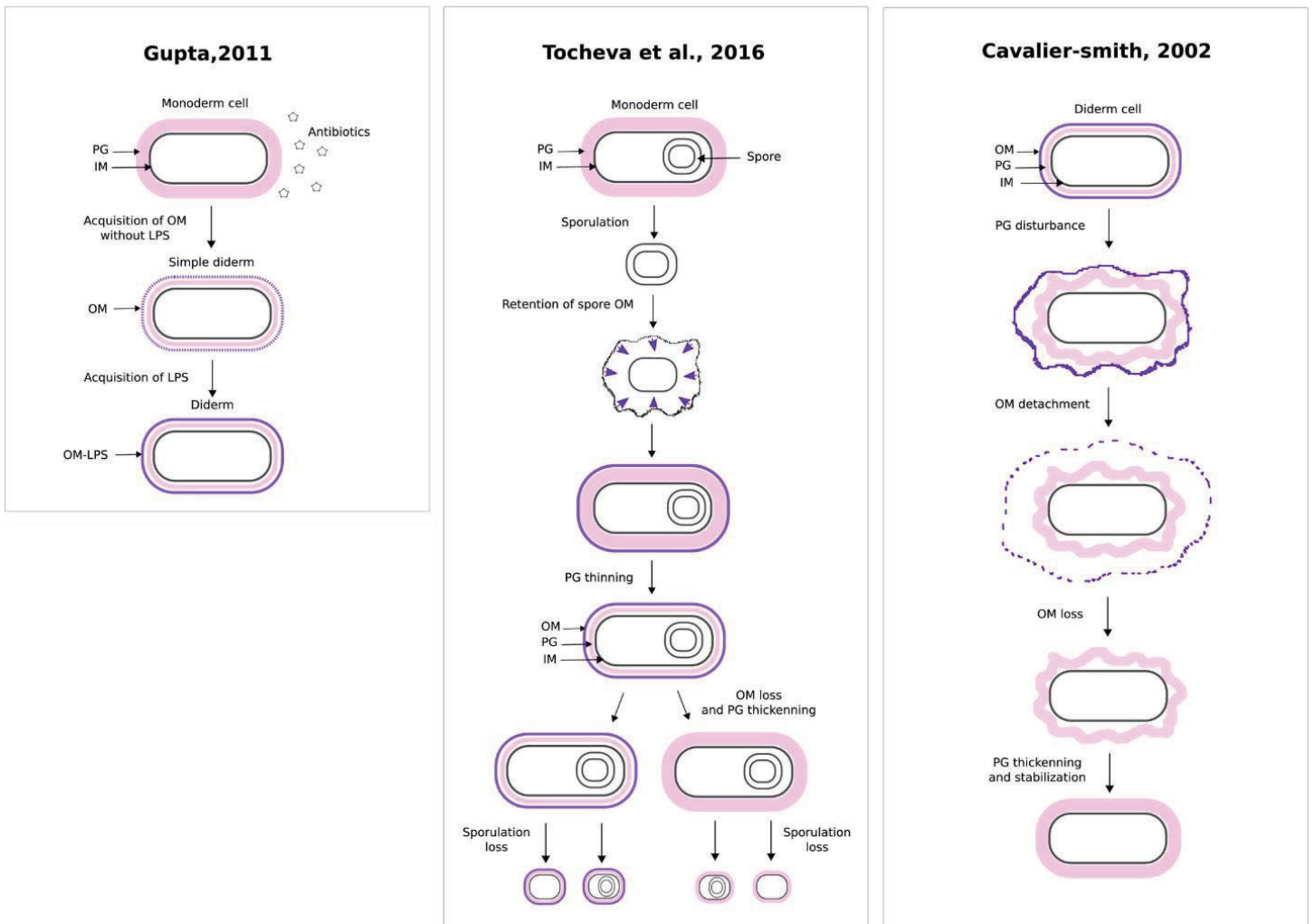


Figure 5. Origine et évolution de la membrane externe (ME) selon Gupta, Cavalier-Smith et Tocheva. A gauche, selon de Gupta, l'acquisition de la ME aurait été favorisée par la pression de sélection induite par les antibiotiques présents dans l'environnement (Gupta 2011). **Au centre,** Tocheva propose que la didermie aurait été acquise par un phénomène d'internalisation de la spore d'une bactérie monoderme (Tocheva *et al.* 2016). Cavalier-Smith propose quant à lui que les bactéries monodermes sont issues des bactéries didermes ayant perdu leur ME. La perte de la ME serait un évènement accidentel survenu après la mutation dans la machinerie de synthèse de PG, qui aurait permis l'épaississement de la paroi et la disparition des systèmes d'attachement de la paroi (Cavalier-Smith 2006). Le PG est en rose, la ME est en violet, et la membrane cytoplasmique, en noir.

que les défauts de croissance observés chez un mutant de *S. aureus* dépourvu d'acides téichoïques pouvaient être corrigés dans un milieu de plus haute osmolarité (Oku *et al.* 2009).

6) Origines de la didermie et de la monodermie

La structure de l'enveloppe du dernier ancêtre commun des bactéries (LBCA, last bacterial common ancestor) était-elle diderme ou monoderme ? La transition entre ces deux types d'enveloppe bactérienne, transformation majeure au sein du règne bactérien, demeure une question fondamentale non résolue dans le domaine de l'évolution (Taib *et al.* 2020). Deux principales hypothèses s'affrontent : la première suggère une transition de bactérie monoderme à diderme, caractérisée par l'acquisition d'une membrane externe (ME) et la réduction de l'épaisseur de la paroi bactérienne (Léonard *et al.* 2022) ; la seconde favorise l'idée d'une transition de bactérie diderme à monoderme, marquée par la perte de la ME et l'épaississement de la paroi bactérienne d'un ancêtre diderme (Léonard *et al.* 2022).

Certains évolutionnistes privilégient le scénario selon lequel les bactéries monodermes seraient les ancêtres des bactéries didermes (Errington 2013; Léonard *et al.* 2022; Tocheva *et al.* 2011) (Fig. 5). Selon ce modèle, la didermie aurait été acquise par le biais d'un événement d'endosymbiose impliquant une bactérie monoderme (Lake 2009). Tocheva et ses collègues présentent des preuves en faveur de cette hypothèse basées sur l'observation de la bactérie diderme *Acetomonas longum* en cryo-tomographie électronique (ECT). D'une part, *A. longum* est capable de former des spores dans son périplasma, bien que la sporulation soit normalement considérée comme une caractéristique des monodermes (Tocheva *et al.* 2016) (Fig. 5). D'autre part, les spores de cette bactérie peuvent être internalisées, et en conséquence, la membrane cytoplasmique de la bactérie-mère est invaginée, puis inversée lors de l'internalisation de la spore. Ainsi, la membrane cytoplasmique de la bactérie-mère devient la membrane externe (ME) de la spore. Selon les auteurs, ce phénomène pourrait préfigurer l'apparition de la didermie chez les ancêtres bactériens monodermes (Tocheva *et al.* 2016) (Fig. 5). Cependant, les événements exacts ayant conduit à l'apparition des bactéries didermes à lipopolysaccharides (LPS) demeurent encore inconnus. Par ailleurs, Gupta suggère que l'acquisition de la didermie aurait pu être favorisée par la pression de sélection induite par l'exposition des bactéries aux antibiotiques (Gupta 2011) (Fig. 2). En effet, pour empêcher les molécules toxiques d'atteindre le PG et le cytoplasme, les bactéries auraient évolué une barrière hydrophobe supplémentaire, la ME, imperméable à de nombreux antibiotiques (Blair *et al.* 2015; Miller 2016) (Fig. 5). Cependant, cette hypothèse intéressante est contestée par d'autres études, qui suggèrent que les bactéries didermes sont apparues bien avant les bactéries monodermes (Cavalier-Smith 2006; Griffiths *et al.* 2007; Valas et Bourne 2011; Witwinowski *et al.* 2022).

L'hypothèse inverse, de la transition de la didermie à la monodermie, est notamment confortée par des preuves phylogénétiques. Ainsi, l'analyse phylogénétique récente révèle que la majorité des phyla bactériens sont principalement composés de bactéries didermes, tandis que les bactéries monodermes ne forment pas un groupe monophylétique (Megrian *et al.* 2020). Par exemple, parmi les deux grands clades qui réunissent toutes les bactéries, les Terrabactéries et les Gracilicutes, le dernier clade ne comporte que les bactéries didermes, tandis que les Terrabactéries incluent mono-

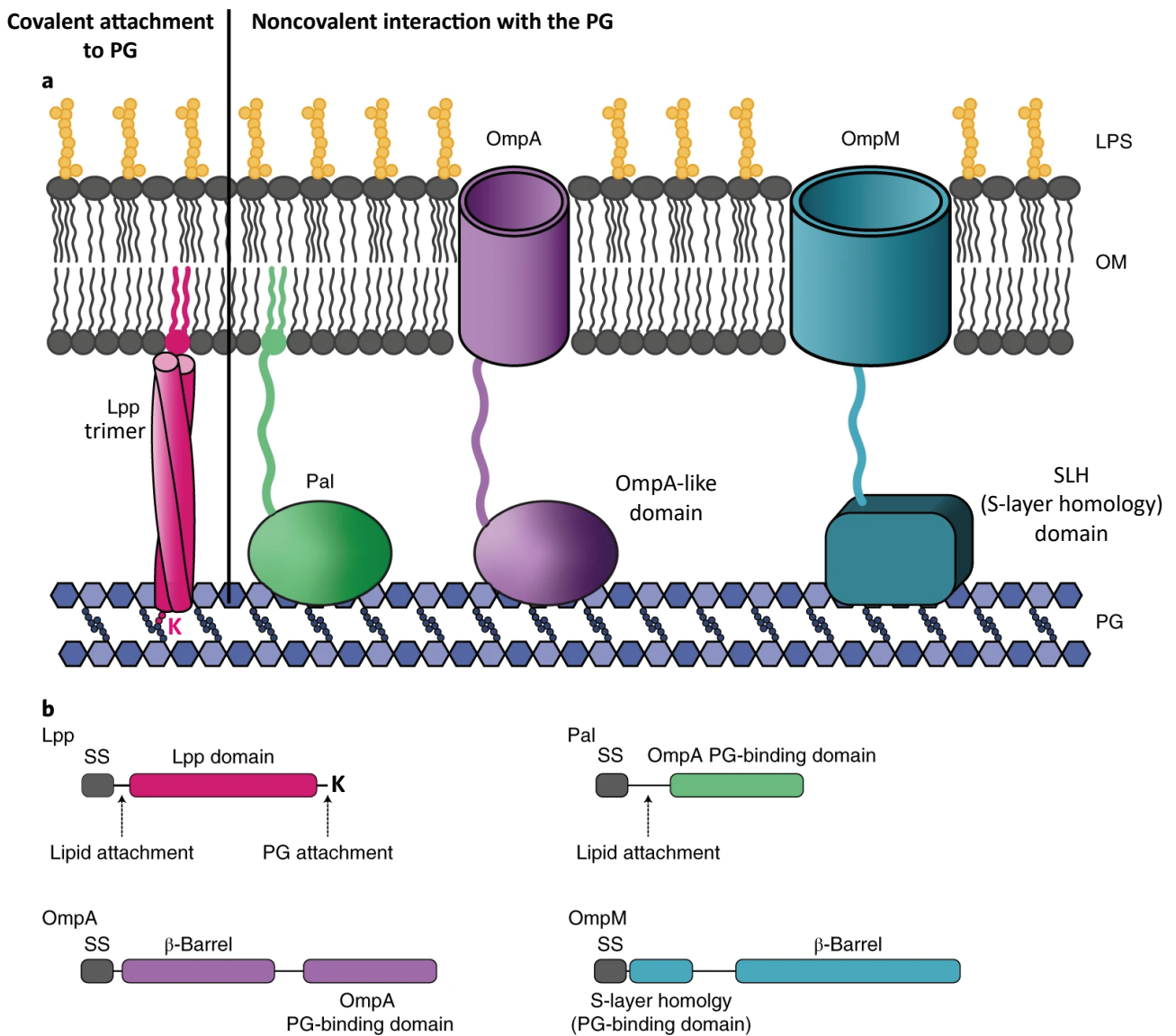


Figure 6. Représentation des quatre systèmes d'attachement de la membrane externe (ME) au peptidoglycane (PG). **a.** En rose, la lipoprotéine Lpp, ancrée à la ME par son extrémité N-terminale lipidée, est attachée de façon covalente au PG via sa lysine (K) C-terminale. Trois monomères de Lpp s'assemblent pour former une triple hélice α . Lpp serait le résultat d'une évolution récente de système d'attachement de la ME, puisqu'elle est uniquement présente dans un sous-groupe des protéobactéries, appelé γ -protéobactéries. **En vert**, la lipoprotéine Pal, ancrée à la ME, comme Lpp par son extrémité N-terminale lipidée, interagit de façon non covalente avec le PG grâce à son domaine OmpA-like. Le domaine OmpA-like est également présent chez OmpA, **en violet**, dont le tonneau- β est inséré dans la ME. OmpA et Pal sont présentes chez la plupart des Gracilicutes. **En bleu**, OmpM interagit quant à elle avec le PG de façon non covalente grâce à son domaine SLH (S-layer homology). OmpM est présente chez certaines Terrabacteria, monodermes et diderme. OmpM constituerait un système ancestral d'attachement de la ME. **b.** Représentation des domaines des protéines. SS, séquence signal. D'après Witwinowski *et al.* 2022.

et didermes (Witwinowski *et al.* 2022) (Fig. 7). En particulier, parmi les Firmicutes qui font partie des Terrabactéries, on trouve au moins trois groupes indépendants composés de bactéries didermes à LPS, tels que Négativicutes, Halanaerobiales et Limnochordia, tandis que les autres groupes de Firmicutes n'incluent que les monodermes. Ces analyses suggèrent donc que la membrane externe est un caractère ancestral de Firmicutes qui a été perdu à plusieurs reprises au cours de l'évolution, donnant lieu aux quelques groupes de bactéries monodermes (Coleman *et al.* 2021; Taib *et al.* 2020; Witwinowski *et al.* 2022).

Des preuves plus solides en faveur de la primauté de la didermie provient de l'étude phylogénétique récente de Coleman et collègues (Coleman *et al.* 2021). Sur la base d'analyse de 11 272 familles de gènes intégrant des séquences issues de métagénomiques, les auteurs ont conclu que le dernier ancêtre commun des bactéries (LBCA) se situe entre les deux clades majeurs, les Terrabactéries et les Gracilicutes (Fig. 7). D'après cette étude, le LBCA était une bactérie diderme, dotée d'une ME à LPS et possédant une panoplie de systèmes présents chez les didermes actuelles, tels que les flagelles, les pili de type IV, la machine de division associée à FtsZ, etc (Coleman *et al.* 2021). L'apparition de groupes monodermes dans le clade de Terrabactéries, est donc survenue à plusieurs reprises au cours d'évolution. Cependant, les modèles soutenant l'apparition plus tardive de monodermie ne permettent pas actuellement d'expliquer les mécanismes de transition ayant conduit à l'épaississement de la paroi bactérienne. Néanmoins, ces travaux récents remettent fondamentalement en question la vision de l'évolution des bactéries qui prévalait il y a seulement dix ans.

La didermie est intrinsèquement liée aux mécanismes d'attachement de la ME à la couche de PG, indispensable au maintien de l'intégrité de l'enveloppe. Ainsi, l'analyse phylogénétique récente a démontré que la scission du règne bactérien en deux clades, les Terrabactéries et les Gracilicutes, coïncide avec la présence dans ces clades de deux systèmes d'attachement majeurs de la ME, respectivement les porines OmpM et OmpA (Witwinowski *et al.* 2022) (Fig. 7). La protéine OmpA possède un domaine de liaison OmpA-like au PG, tandis que la protéine en tonneau- β OmpM possède un domaine de liaison au PG, appelé S-Layer Homology (SLH) (Fig. 6). OmpM joue un rôle majeur dans le maintien de la stabilité de la ME chez les Terrabacteria grâce à son interaction avec le PG cadavériné contenant des polyamines. La cadavérine (pentaméthylènediamine $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$) se lie covalamment au groupe α -carboxyle du résidu MurNac par l'un de ses deux groupes aminés, ce qui est observé chez *Selenomonas ruminantium*, *Veillonella alcalescens*, *Veillonella parvula* et *Anaerovibrio lipolyticus* (Kojima *et al.* 2010). *V. parvula*, une bactérie diderme à LPS, possède 4 copies du gène *ompM* (Witwinowski *et al.* 2022). Witwinowski et ses collaborateurs montrent que la perte de ce système d'ancrage de la ME par la délétion des quatre copies d'*ompM* n'est pas létale pour la bactérie. La délétion des gènes *ompM1-3* entraîne un gonflement important de la ME, ainsi que des défauts de croissance marqués et une sensibilité accrue au SDS, à l'EDTA et à la vancomycine. En revanche, la délétion des gènes *ompM4* et *ompA* ne cause aucun phénotype particulier (Witwinowski *et al.* 2022). La non-létalité de la perte d'OmpM suggère que plusieurs ancêtres bactériens didermes ont pu perdre indépendamment les gènes *ompM*, expliquant ainsi l'apparition du caractère monoderme dans divers phyla. L'absence d'un système alternatif d'ancrage de la ME chez les Terrabactéries aurait ainsi favorisé la perte de la ME, marquant l'émergence des bactéries monodermes (Witwinowski *et al.* 2022). Un

phénotype similaire a été observé chez la bactérie *Deinococcus radiodurans*, qui possède une protéine abondante de la ME appelée SlpA. SlpA est composée d'un tonneau- β , d'un domaine coiled-coil et d'un domaine SLH, homologue à OmpM et également retrouvée chez les bactéries du genre *Deinococcus/Thermus* ainsi que chez les cyanobactéries (von Kùgelgen *et al.* 2022; Witwinowski *et al.* 2022). La porine OmpA représente un homologue fonctionnel d'OmpM chez les Gracillicutes. OmpA possède un domaine en tonneau- β et un domaine de liaison au PG (appelé OmpA-like). Même si les liens phylogénétiques entre OmpM et OmpA semblent assez évidents, il n'est pas possible actuellement de tracer leur évolution (Witwinowski *et al.* 2022). Ainsi, OmpM et OmpA représenteraient les deux systèmes d'ancrage ancestraux des bactéries didermes (Mandela *et al.* 2022; Witwinowski *et al.* 2022). Enfin, les systèmes d'ancrage de la ME couramment étudiés, tels que les lipoprotéines Pal et Lpp, ne seraient apparus que plus récemment chez les Gracillicutes. Bien que Pal soit retrouvée dans plusieurs groupes de Gracillicutes, Lpp n'est présente que chez un sous-groupe de γ -protéobactéries et une δ -protéobactérie (Witwinowski *et al.* 2022) (Fig. 8). L'apparition de ces deux lipoprotéines a été rendue possible par l'acquisition préalable du système LOL d'adressage de lipoprotéines. La présence chez les protéobactéries de trois systèmes parallèles d'accrochage de la ME au PG, OmpA, Pal et Lpp, montre l'importance de cette fonction pour la survie des bactéries.

7) Systèmes de transport de protéines à travers l'enveloppe

Chez les bactéries à Gram négatif, la majorité des protéines de la ME sont des lipoprotéines ou des porines (OMPs en tonneau- β) (Konovalova *et Silhavy* 2015; Shearer *et al.* 2019; Solan *et al.* 2021). Les précurseurs de ces protéines sont synthétisés dans le cytoplasme. Deux obstacles s'opposent à l'adressage de ces protéines à la ME. Ces protéines hydrophobes doivent d'abord traverser la membrane cytoplasmique. Elles doivent ensuite traverser l'environnement aqueux du périplasma. Pour cela, les systèmes spécialisés de l'adressage à la ME, comme BAM et Lol interviennent pour transporter des porines en tonneau- β et lipoprotéines, respectivement (Fig. 10). En outre, divers systèmes spécialisés assurent l'adressage des composants de la ME (LPS et protéines) ou la translocation des molécules à l'extérieur de la bactérie.

a. Passage à travers la MI : deux systèmes majeurs, Sec et Tat

Les systèmes Sec (general secretion pathway) et Tat (twin-arginine translocation) sont deux systèmes indépendants permettant la translocation de protéines à travers la membrane cytoplasmique (Berks, Palmer, et Sargent 2005; Osborne, Rapoport, et van den Berg 2005) (Fig. 9.B). Ces translocons sont partagés par les règnes bactériens, eucaryotes (réticulum endoplasmique, Sec ; membrane des thylakoïdes, Sec et Tat) et archéens. Les protéines sont synthétisées dans le cytoplasme sous forme de précurseur contenant une séquence signal en N-terminal. La séquence signal est reconnue par les systèmes Sec ou Tat situés à la membrane cytoplasmique. Chacun des deux systèmes possède des particularités : alors que le système SecYEG prend en charge des protéines non repliées, qui se replient ensuite dans leur structure native côté trans de la membrane cytoplasmique, le système Tat quant à lui transporte des protéines déjà repliées possédant souvent des cofacteurs au sein de leur

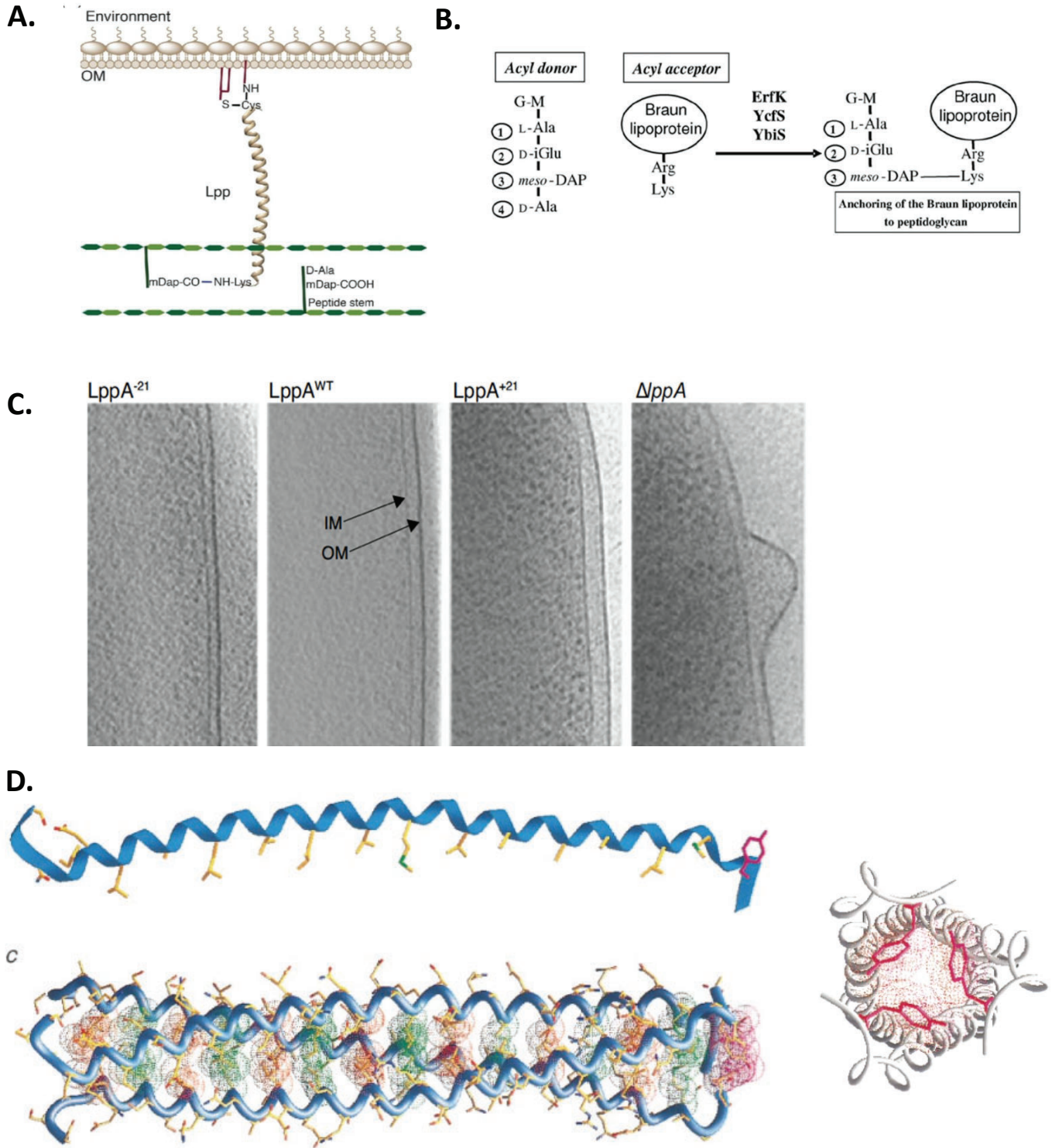


Figure 8. La lipoprotéine de Braun (Lpp) sert à l'ancrage de la membrane externe. **A.** Lpp est ancrée dans la membrane externe par trois acides gras reliés à la cystéine N-terminale. La lysine C-terminale de Lpp est attachée de manière covalente au peptidoglycane. Ainsi, Lpp forme une sorte de ressort qui attache le PG à la ME. D'après Asmar *et al.* 2018. **B.** les L,D-transpeptidases ErfK, YcfS et YbiS (LdtA, LdtB et LdtC, respectivement) catalysent le couplage de la lipoprotéine de Braun au PG. D'après Magnet *et al.* 2007. **C.** La modification de la longueur de Lpp induit une variation de la taille du périplasm. On voit le rapprochement de deux membranes par une Lpp raccourcie ($LppA^{-21}$) et l'éloignement de deux membranes par une Lpp rallongée ($LppA^{+21}$). La délétion de *lppA* engendre la formation de « blebs » ou bulles, qui sont une proéminence de la membrane externe. D'après Cohen *et al.* 2017. **D.** Les cycles aromatiques de la tyrosine⁵⁶ de Lpp (en rouge) permettent de stabiliser la formation du trimère de Lpp. D'après Shu *et al.* 2000.

structure tertiaire (Frain *et al.* 2019) (Fig. 9.B). Bien que les séquences signal reconnues par ces deux systèmes soient assez similaires, le mécanisme de translocation des protéines est très différent.

Le système Sec est constitué de trois protéines formant un récepteur et un translocon dans la membrane cytoplasmique (SecY, E et G) et d'une ATPase appelée SecA (Lycklama a Nijeholt *et Driessen* 2012) (Fig. 9.B). Deux mécanismes de translocations par le système Sec sont décrits : un mécanisme co-translationnel et un mécanisme post-translationnel. Dans le cas d'une translocation post-translationnelle, la protéine-substrat est intégralement synthétisée sur le ribosome dans le cytoplasme, puis est menée au translocon Sec par la chaperonne SecB chargée de maintenir la protéine néosynthétisée dans une conformation compatible avec sa translocation (Itskanov *et Park* 2019) (Fig. 9.B.). Dans le cas de la co-translocation, le complexe SRP (signal recognition particule) s'attache directement à la séquence signal, dès les premières étapes de synthèse du peptide par le ribosome. Le système ternaire ribosome-protéine-SRP est ensuite dirigé au translocon Sec. La séquence signal est reconnue puis transférée au système Sec, avec l'aide des protéines récepteur FtsY ou SRP (Hwang Fu *et al.* 2017) (Fig. 9.B).

Le système Tat est constitué des protéines TatA, B et C, chez *E. coli* et Tat A et C chez *S. aureus* et *B. subtilis* (Lee *et al.* 2006). Contrairement au système Sec ATP-dépendant, le fonctionnement du système Tat dépend exclusivement de la force proton motrice (PMF) (Hamsanathan *et Musser* 2018) (Fig. 9.B). L'expression de *tatA* excède de 25 fois l'expression de *tatB* et de 50 fois l'expression de *tatC* (Jack *et al.* 2001). En conséquence, TatA qui forme le canal du translocon, est la plus abondamment exprimée. Le complexe TatBC forme quant à lui un récepteur reconnaissant le substrat du translocon. TatC, la protéine la plus conservée, est formée de 6 hélices transmembranaires. Elle est la première protéine interagissant avec le substrat de Tat via son peptide-signal. À la suite de la reconnaissance, le domaine H du peptide-signal interagit avec TatB (Zhang *et al.* 2014). Le domaine C du peptide-signal est ensuite reconnu et son site de clivage est clivé par une signal-peptidase (Ramasamy *et al.* 2013). Certaines archées et bactéries à Gram-positif possèdent de multiples copies de ces gènes. *B. subtilis* par exemple, possède deux opérons *tatAdCd* et *tatAyCy* codant pour des systèmes Tat spécifiques d'un substrat : les préprotéines PhoD et YwbN respectivement (Jongbloed *et al.* 2004). Les substrats du système Tat sont impliqués dans des fonctions tant variées que cruciales pour la survie de la bactérie. Par exemple, ces protéines sont impliquées dans la biogenèse de l'enveloppe, l'acquisition de métaux, la virulence, la détoxification et le métabolisme anaérobie (Liu *et al.* 2020). Par ailleurs, l'amidase AmiC qui est impliquée dans la modification du PG septal chez *E. coli* est transloquée dans le périplasme par le système Tat (Bernhardt *et De Boer* 2003). Toutefois, le nombre de substrats transportés par Tat varie selon la bactérie considérée. Par exemple, *Streptomyces coelicor* possède 129 substrats potentiels de Tat (prédits *in silico*), dont 43 ont été confirmés expérimentalement (Li *et al.* 2005; Widdick *et al.* 2006), alors que *P. aeruginosa* possède 44 substrats putatifs du système Tat dont 34 ont été validés expérimentalement (Gimenez *et al.* 2018). Le système d'adressage Tat serait nécessaire lorsque le repliement complet de la protéine est indispensable avant sa translocation à travers la membrane. C'est notamment le cas de protéines portant des cofacteurs dans leur structure tertiaire. Par exemple la glucose-fructose oxidoreductase de la bactérie à Gram-négatif *Zymomonas mobilis*, fixe le NADP avant d'être transloquée par le système Tat (Halbig *et al.* 1999). Halbig et ses collaborateurs ont montré par une expérience de pulse-chase que la protéine mutée ayant un défaut

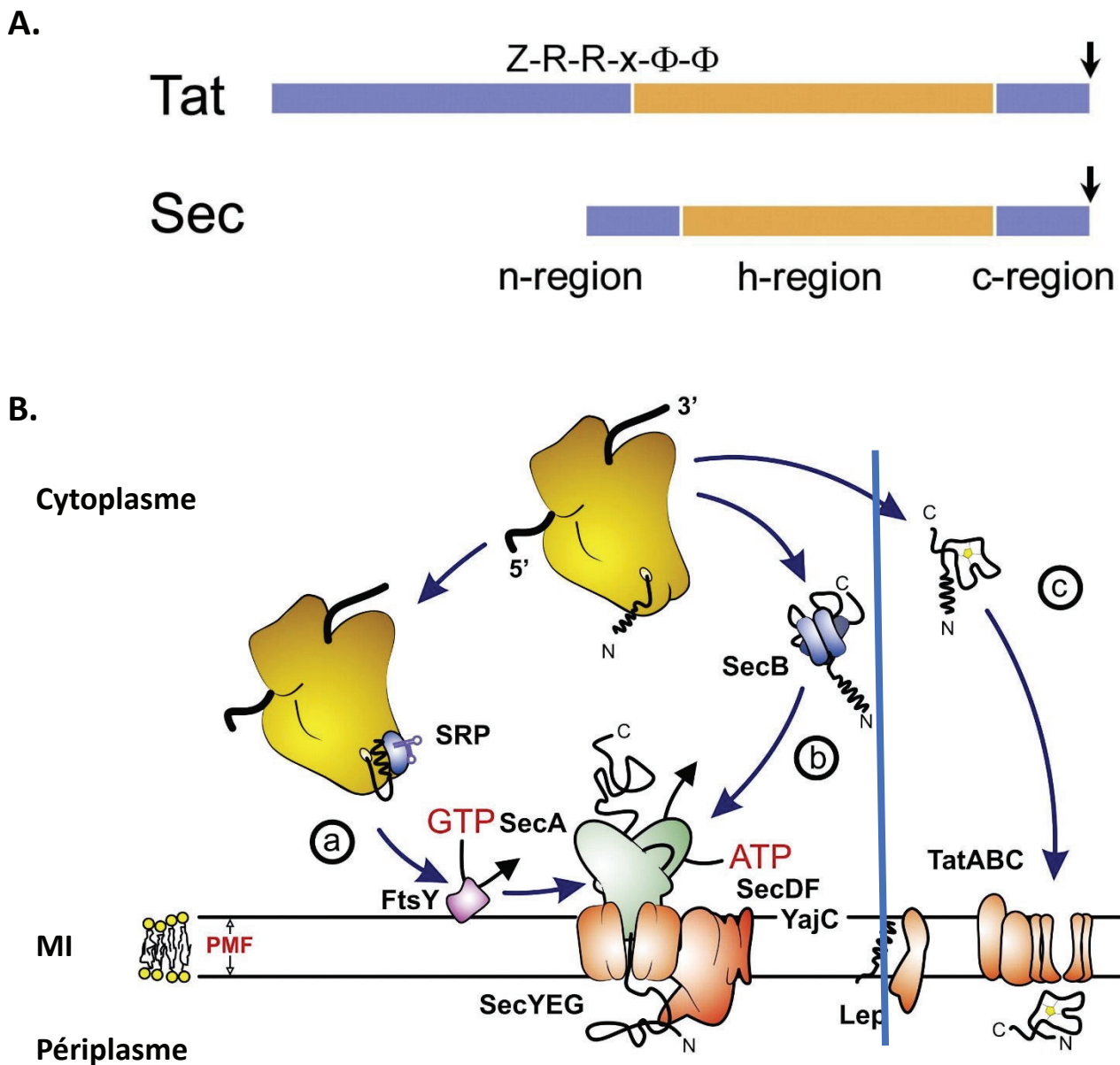


Figure 9. Systèmes SecYEG et Tat chez *E. coli*. **A.** Comparaison de la séquence des peptides signal de substrats des systèmes Tat et Sec. Les peptides signal possèdent une région-n, polaire chargée positivement. La région-n est plus longue chez les substrats du système Tat. La région-h est hydrophobe et non chargée. La courte région-c polaire constitue le site de clivage de la signal-peptidase de type I. **B. Systèmes de translocation de protéines SecYEG et Tat chez *E. coli*.** Le ribosome (en jaune) synthétise la protéine, puis celle-ci est acheminée aux translocons SecYEG ou Tat. Le système SecYEG prend en charge des protéines non repliées. La translocation peut être co-traductionnelle **a**, ou post-traductionnelle **b**. Translocation des protéines repliées contenant ou non un ligand (étoile jaune), par le translocon Tat. Une signal-peptidase clive la séquence signale. D'après Natale *et al.* 2008.

de fixation du NADP a présenté une cinétique d'export significativement diminuée (Halbig *et al.* 1999). Ces contraintes excluent irrémédiablement l'utilisation du système Sec pour la translocation de telles protéines à travers la membrane cytoplasmique.

Peptide Signal

La fonction et la structure du peptide signal reconnu par le système Sec sont bien conservées. Typiquement, il s'agit d'une séquence d'une vingtaine d'acides aminés constituée d'une région N, chargée positivement, d'une région H, hydrophobe, et d'une région C-terminal polaire, appelée région C (Fig. 9.A). Or, selon la protéine exportée, la longueur du peptide signal peut atteindre jusqu'à une quarantaine de résidus. Ce peptide-signal est clivé par la peptide-signal peptidase I, LepB (Kaushik *et al.* 2022).

Le peptide-signal des lipoprotéines est similaire à celui des substrats du système Sec. Il possède les domaines N, H et C. La différence majeure réside en la présence d'un motif Leu-Ala/Ser-Gly/Ala-Cys en position -3 et +1 appelé lipobox (Sankaran *et Wu* 1994). Dans la structure mature de la lipoprotéine, la cystéine +1 est modifiée par l'ajout d'un diacylglycéryl à la préprolipoprotéine avant le clivage du peptide-signal par la signal-peptidase II, LspA (Sankaran *et Wu* 1994).

La séquence signal des substrats de Tat possède également les régions N, H et C, mais diffère sensiblement (Fig. 9.A). Comme le nom du système l'indique, la séquence signal Tat possède deux arginines bien conservées, reconnues par le translocon. Ces arginines sont importantes pour la reconnaissance du substrat, puisque la modification de celles-ci diminue significativement l'efficacité de la sécrétion des substrats de Tat (Halbig *et al.* 1999). Cependant, il a été montré qu'un substrat naturel du système Tat portait un motif lysine-arginine (Molik *et al.* 2001). Les séquences signal Tat sont en moyenne plus grandes que les séquences Sec car la région N est généralement plus longue (Fig. 9.A). Tout comme le peptide-signal de Sec, l'enzyme responsable du clivage du peptide-signal Tat est la signal-peptidase I, LepB (Kaushik *et al.* 2022). Les substrats Tat lipoprotéines quant à eux, portent une lipobox à la fin du peptide signal avec une cystéine en position +1. Ces peptides signal sont clivés par la signal-peptidase II, LspA.

a. Exportation des protéines à la ME

Contrairement à la membrane cytoplasmique, la ME est uniquement constituée de protéines de type lipoprotéines ou de protéines en tonneau- β (Fig. 2). L'adressage et l'assemblage de ces protéines dans la ME requiert des systèmes spécialisés : le système Lol pour l'adressage de lipoprotéines, et le système BAM pour l'adressage et le repliement des protéines en tonneau- β (Fig. 10).

Cas des lipoprotéines

Le système Lol (Localization of lipoprotein) permet le tri et l'adressage des lipoprotéines dans la ME (Fig. 10). Le précurseur de lipoprotéine possède un peptide signal spécial avec le résidu de cystéine comme premier acide aminé de la lipoprotéine mature. Le précurseur est inséré dans la membrane

LPS

Assemblage des protéines en tonneaux- β et des lipoprotéines à la ME

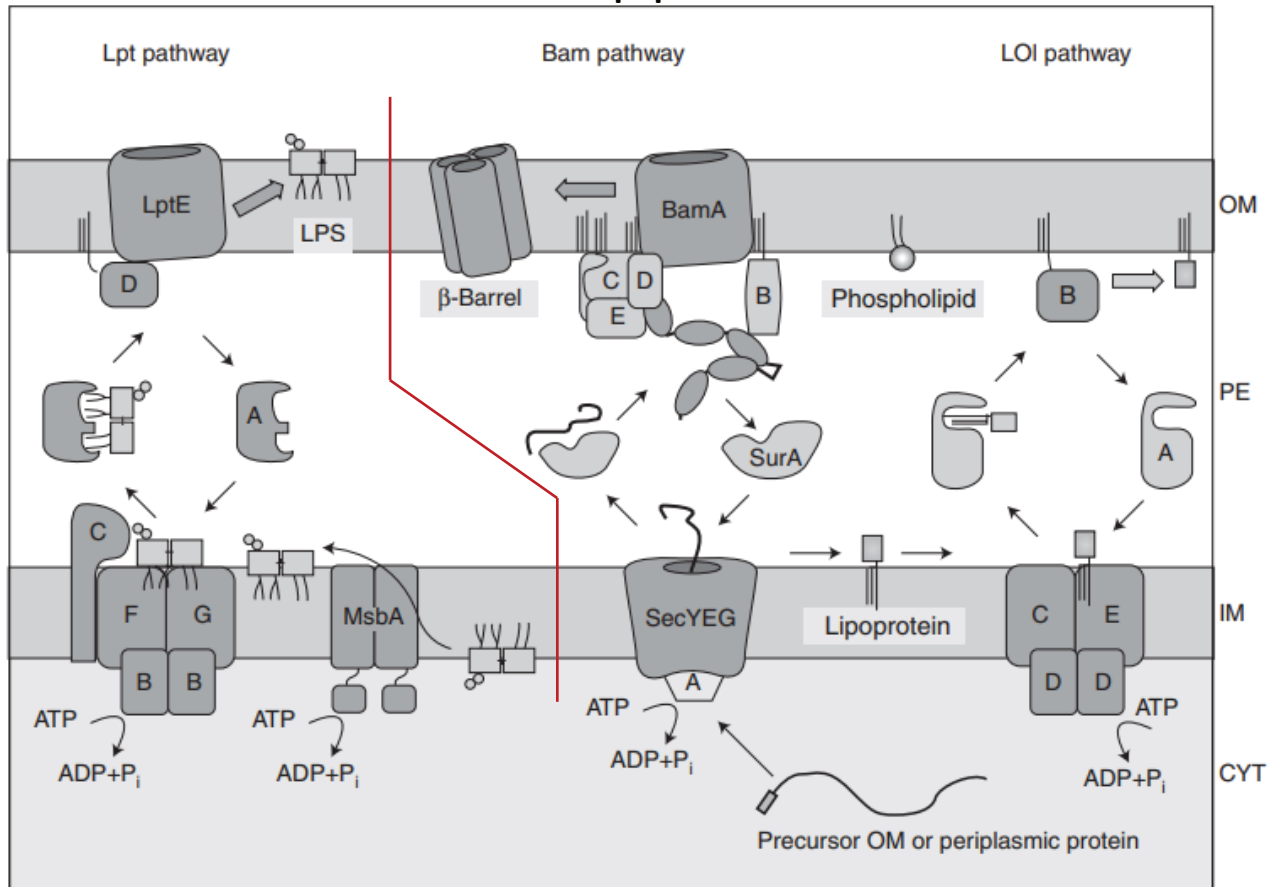


Figure 10. Machineries cellulaires responsables de la biogenèse de la membrane externe (ME). Les lipopolysaccharides (LPS) de ME sont synthétisés et assemblés dans la MI par MsbA, puis sont exportés dans le feuillet externe de la ME par le système Lpt. Les précurseurs de tonneaux- β et de lipoprotéines sont synthétisés dans le cytoplasme avec une séquence signal N-terminale, qui les dirige vers le système Sec pour la translocation à travers la MI. La chaperone SurA délivre le tonneau- β à la machinerie BAM, chargée de l'assemblage des tonneaux- β dans la ME. Dans le cas des lipoprotéines, la séquence signal est clivée et les acides gras sont attachés à la cystéine N-terminale. LolA est chargée du transport de la lipoprotéine à la ME, et LolB est chargée de son insertion dans le feuillet interne. D'après Silhavy *et al.* 2010.

cytoplasmique par le système SecYEG et acheminé vers le transporteur ABC (ou transporteur à cassettes liant l'ATP), LolCDE (Fig. 10) (Cole *et al.* 2021; Nickerson *et al.* 2018). Lors de ce passage, la préprolipoprotéine subit une première lipidation par l'addition de deux acides gras au groupement sulfhydryle de la cystéine par la diacylglycérile transférase Lgt. Le peptide signal est ensuite coupé par la signal peptidase LspA et une troisième chaîne d'acide gras est ajoutée à la cystéine par la N-acyltransférase Lnt. La chaperonne périplasmique LolA récupère la lipoprotéine mature du complexe LolCDE et la transporte à travers le périplasme jusque dans la ME, où la lipoprotéine est insérée avec l'assistance de la protéine LolB (Fig. 10). Les lipoprotéines ne sont pas considérées comme des protéines transmembranaires à part entière car aucun acide-aminé de la lipoprotéine ne traverse le feuillet lipidique de la membrane. En effet, seule la partie lipidée couplée à la cystéine est ancrée dans la ME. Le système Lol n'est présent que chez les Gracilicutes, une division des bactéries incluant les Protéobactéries, les Planctobactéries, les Sphingobactéries et les Spirochètes. Ce système semble être absent chez les Terrabactéries (à l'exception de *Deinococcus*), bien que cette division inclue plusieurs groupes de bactéries didermes à LPS (Witwinowski *et al.* 2022). La présence du système Lol chez les Gracilicutes coïncide avec la présence exclusive de la lipoprotéine Pal dans cette division (Pal est absent chez les Terrabactéries).

Rondelet et Condemine ont décrit pour la première fois un cas particulier de protéines adressées à la ME (Rondelet *et Condemine* 2012). Les auteurs ont montré que PnlH, un homologue de pectine lyase, était ancrée à la ME grâce à une séquence d'adressage présentant des similarités avec la séquence signale tat (Ferrandez *et Condemine* 2008, Rondelet *et Condemine* 2012). Ce exemple illustre l'existence d'un troisième type de protéines adressées à la ME, ne possédant pas d'acylation N-terminale comme les lipoprotéines, ni de tonneau- β transmembranaire, comme les OMPs (Rondelet *et Condemine* 2012).

Cas des OMPs

Après la translocation des précurseurs d'OMPs à travers la MI par le système Sec, ceux-ci sont pris en charge dans le périplasme par les protéines chaperonnes SurA et Skp qui le délivrent à la machinerie BAM à la ME (Fig. 10). Le système BAM (β -barrel Assembly Machinery) est un complexe de 203 kDa chargé de faciliter l'insertion et le repliement d'OMPs dans la ME (Ricci *et Silhavy* 2019). SurA est la chaperonne majeure dans l'adressage des OMPs à la ME, puisque la délétion de SurA fait chuter la densité en OMPs de la ME (Sklar *et al.* 2007), mais pas la délétion de Skp. Cependant, il a été montré que la chaperonne Skp et la protéase DegP jouent également un rôle dans l'adressage des OMPs. L'importance de leur rôle est notamment amplifiée en absence de SurA. Noinaj et ses collaborateurs proposent que Skp/DegP forment une voie d'adressage parallèle dont l'activation dépend de l'état de stress de la bactérie (Noinaj *et al.* 2017). Une fois le complexe chaperonne-précurseur d'OMP arrivé à la ME, celui-ci est pris en charge par le complexe BAM (Fig. 10). Il est composé d'une protéine-cœur hautement conservée BamA, et de 4 lipoprotéines additionnelles BamB, C, D, E (Noinaj *et al.* 2017). Les premières structures de BAM ont été obtenues chez *E. coli* en 2016 (Gu *et al.* 2016; Han *et al.* 2016). Plus récemment, les études de cryo-EM ont fourni la preuve d'une interaction directe entre BamA et son substrat durant la biogenèse de l'OMP à la ME (Tomasek *et al.* 2020). BamA et BamD sont

des protéines essentielles à la viabilité de la bactérie et sont indispensables au fonctionnement de BAM (Sandoval *et al.* 2011). Les composants BamC, D et E sont considérés comme des régulateurs (Kumar *et Konovalova* 2023) (Fig. 10). BamB est un régulateur de BamA tandis que BamC et E serviraient de régulateurs de BamD. Il semble donc que chacun des composants BCDE joue un rôle dans l'assemblage de complexes spécifiques. Par exemple, Kumar et ses collaborateurs ont montré que BamE assemblait spécifiquement la lipoprotéine RcsF et ses partenaires OMPs lors de la mise en place de la réponse Rcs (Kumar *et Konovalova* 2023). La provenance de la source d'énergie nécessaire au fonctionnement de BAM n'est pas encore déterminée. En effet, le périplasma ne contient pas de source d'énergie sous forme d'ATP (Noinaj *et al.* 2017). L'hydrolyse de l'ATP ne serait pas utilisable comme une source d'énergie au niveau de la ME. Gessmann et ses collaborateurs ont montré que le complexe BAM agissait lui-même comme un catalyseur en abaissant l'énergie d'activation nécessaire à l'insertion de protéines dans la ME imposée par les phospholipides. En conséquence, cela rend possible l'insertion des OMPs dans la ME malgré l'absence de source d'énergie sous forme d'ATP (Gessmann *et al.* 2014).

8) Biogenèse de la ME

La ME est asymétrique. Le feuillet de la ME en contact avec le milieu extérieur est composé de LPS, alors que le feuillet interne est composé de phospholipides. La biogenèse de la ME est un processus complexe et hautement coordonné prenant place dans le cytoplasme et dans la membrane cytoplasmique (Lundstedt *et al.* 2021). La mise en place de la ME nécessite donc le transport et l'assemblage à travers l'enveloppe bactérienne.

a. Biosynthèse et adressage du LPS à la ME

Le LPS (voir sa composition §I.3) est assemblé dans cytoplasme et la face interne de la MI, avant d'être transloqué à la face externe de la MI, puis d'être transporté à la ME. Sa synthèse par la voie « Raetz » est en fait un processus complexe coordonné spatialement et temporellement qui a été extensivement étudiée chez *E. coli* et *Salmonella* (Raetz *et al.* 2009; Sperandeo *et al.* 2017). Elle est initiée par l'assemblage du lipide A (Ulaganathan *et al.* 2007), puis le core-oligosaccharide est ajouté sur le lipide A par la glycosyltransférase Waa (Fig. 10). Le lipide A + core-oligosaccharide du LPS est ensuite retourné à la face périplasmique de la MI par MsbA (Fig. 10). Les unités d'antigènes-O synthétisées dans le cytoplasme sont assemblées dans le périplasma sur la molécule de lipide A + core-oligosaccharide par WaaL (Ruan *et al.* 2012). Une fois que le LPS est entièrement assemblé, celui-ci peut être transporté à la ME. L'adressage du LPS à la ME est effectué par le système Lpt, constitué des protéines LptA, B, C, D, E, F et G (Ruiz *et al.* 2009) (Fig. 10). Le complexe LptB₂FG extrait le LPS de la MI. LptB est une ATPase cytoplasmique et LptFG sont deux protéines transmembranaires (Sperandeo *et al.* 2017). Le LPS complet est ensuite transporté à travers le périplasma jusque dans la ME par la protéine LptA. Le complexe LptD/E de la ME se charge de l'insertion du LPS dans le feuillet externe de la ME (Fig. 10).

Des simulations informatiques suggèrent qu'une augmentation du ratio phospholipides/LPS augmente la fluidité de la membrane et donc sa sensibilité aux stress (Shearer *et al.* 2019). La ME ferait donc l'objet d'une homéostasie entre la quantité de LPS et de lipides.

b. Adressage des lipides à la ME

Bien que les études scientifiques soient parvenues à déchiffrer le mécanisme d'adressage du LPS et des lipides à la ME, la chronologie des événements permettant d'assembler une membrane asymétrique reste un mystère. Deux modèles tentent d'illustrer les scénarii envisageables. Le premier propose qu'une membrane symétrique serait initialement assemblée, puis convertie en une membrane à LPS. Le second modèle suggère que l'assemblage du feuillet de LPS est coordonné avec l'assemblage du feuillet lipidique. Durant les prémices de l'étude du transport des phospholipides chez les bactéries à Gram-négatif en 1977, Osborn et Jones ont proposé un modèle d'échanges de lipides s'effectuant aux zones de contact étroit entre la ME et la membrane cytoplasmique. Leur expérience chez *S. typhimurium* montre l'établissement d'un mécanisme de transport bidirectionnel des phospholipides entre les deux membranes. Notamment, l'incorporation de matériel à la ME médiée par des vésicules de phospholipides, pouvait être dirigés à la membrane cytoplasmique, modifiés, puis redirigés à la ME afin d'équilibrer la composition des membranes (Jones *et Osborn* 1977). Malinverni et Silhavy ont mis en évidence un système de transport ABC de phospholipides appelé Mla servant à prévenir l'accumulation de phospholipides dans le feuillet externe de la ME (Malinverni *et Silhavy* 2009). Le rôle principal de ce système est de maintenir l'asymétrie de la ME. Il est composé de 6 protéines MlaA à F une à une située dans chaque compartiment cellulaire. Ce système est conservé chez les bactéries à Gram-négatif, suggérant qu'il joue un rôle primordial dans la biogenèse de la ME (Kamischke *et al.* 2019). Alors que Malinverni et ses collaborateurs proposent un modèle de transport des phospholipides depuis la ME jusqu'à la membrane cytoplasmique, Kamischke et ses collaborateurs montrent que les phospholipides néosynthétisés s'accumulent à la membrane cytoplasmique dans le mutant *m1a* d'*A. baumannii*, ce qui est en faveur d'un transport des lipides de la membrane interne jusque dans la ME (Kamischke *et al.* 2019). Ces deux éléments suggèrent donc qu'un transfert bilatéral est mis en place entre les deux membranes.

Dans le cas d'un transfert de lipides de la ME à la membrane interne, MlaA transférerait un phospholipide à la protéine périplasmique MlaC. Une approche de pontage aux UVs a révélé que ces deux protéines interagissaient (Ercan *et al.* 2019). La résolution de la structure de MlaC par cristallographie aux rayons-X a montré qu'elle possédait une poche hydrophobe dans laquelle était lié un phospholipide, avec lequel MlaA interagit avec une grande affinité (Ekiert *et al.* 2017; Ercan *et al.* 2019). Le phospholipide est ensuite déchargé au complexe ABC-transporteur MlaFEDB dans la membrane interne (Thong *et al.* 2016).

Dans le cas d'un transfert de phospholipides de la membrane interne jusque dans la ME, appelé transport antérograde, deux modèles ont été proposés. Le premier consiste en le transport passif par hémifusion, consistant en l'échange de matériel lipidique par des points de contact étroits entre les deux membranes. La seconde impliquerait des systèmes protéiques établissant un pont entre les deux membranes (qui serait analogue au système Lpt) ou l'implication de chaperonnes solubles permettant

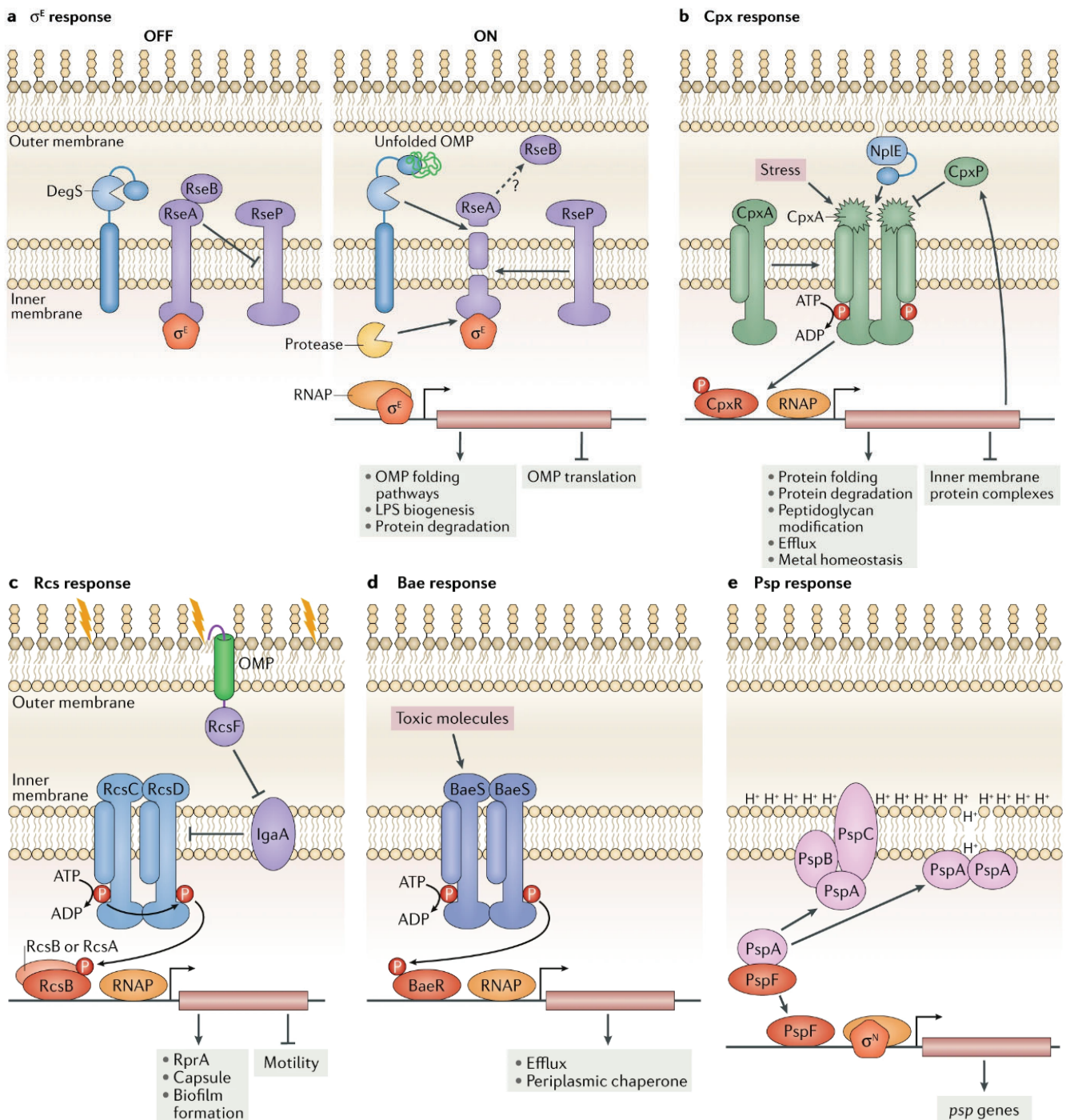


Figure 11. Systèmes de réponse aux stress de l'enveloppe bactérienne. a. Lors de la réponse σ^E , la protéase DegS détecte l'accumulation d'Omps mal repliées à la ME ou la synthèse de formes altérées de LPS. DegS clive le domaine périplasmique de RseA, ce qui libère σ^E dans le cytoplasme. σ^E s'associe à l'ARN polymérase (RNAP), et active ensemble la transcription des gènes des voies de synthèse de LPS, de repliements des OMPs et de dégradation des protéines. **b.** La réponse Cpx est induite par les défauts de synthèse du PG, le stress de repliement des protéines de la MI et les signaux dépendants de la protéine NlpE. CpxP inhibe le système Cpx. La détection de stress induit un changement de conformation du domaine périplasmique de CpxA, qui déclenche la phosphorylation du régulateur transcriptionnel CpxR dans le cytoplasme. Cpx régule notamment les systèmes de réparation/modification du PG, la synthèse de pompes à efflux, les systèmes de dégradation et de repliement des protéines. **c.** La réponse Rcs est impliquée dans la détection de défauts de synthèse du PG, de LPS ou d'adressage des lipoprotéines. Le domaine périplasmique de la lipoprotéine RcsF transduit le signal à la protéine IgaA de la MI. IgaA réprime la kinase RcsC et la phosphotransférase RcsD chargées de phosphoryler RcsB. Lorsque RcsF interagit avec IgaA, le régulateur RcsB est phosphorylé par RcsC/D, ce qui active la transcription des gènes de la capsule et la formation de biofilm. **d.** La détection de molécules toxiques induit l'autophosphorylation de BaeS, qui transfère son groupement phosphate au régulateur BaeR, ce qui active l'expression de chaperonnes périplasmiques et de pompes à efflux. **e.** Le système Psp est activé lors de dommages de la MI impactant sa perméabilité. En cas de stress, les protéines de la MI PspB et PspC interagissent avec la protéine cytoplasmique PspA, ce qui libère PspF qui interagit avec la RNAP, et active l'expression des gènes *psp*. L'oligomérisation de PspA prévient la fuite de protons à travers la MI. D'après Mitchell *et* Silhavy 2019.

le passage de lipides d'une membrane à l'autre (Lundstedt *et al.* 2021). Un autre modèle proposé était l'établissement d'un flux vésiculaire, mais cette idée a été délaissée du fait que la taille de ces vésicules ne permettrait pas le passage à travers les pores du PG (Demchick et Koch 1996; Kulp et Kuehn 2010).

Le système Mla serait donc responsable de la réparation des problèmes de l'asymétrie des membranes lors de l'accumulation des phospholipides à la ME ou à la membrane cytoplasmique. Ces problèmes sont concomitants au défaut de synthèse du LPS, ou à la déstabilisation du LPS à la suite de l'utilisation d'un chélateur d'ions bivalents comme l'EDTA (Leive 1965; Sutterlin *et al.* 2016).

9) Chaperonnes périplasmique et homéostasie du périplasma

Les protéines périplasmiques sont impliquées dans de nombreuses fonctions comme le transport de molécules, la motilité, la communication entre le milieu extérieur et la cellule. Le périplasma est un compartiment plus sensible aux variations physico-chimiques que le cytoplasme (Kim *et al.* 2021). De fait, le mauvais repliement des protéines γ est plus fréquent et un contrôle qualité robuste γ est indispensable. Il est médié par des protéines chaperonnes chargées de reconnaître, replier, désagréger ou dégrader les protéines présentant un défaut de repliement afin de veiller à l'homéostasie dans le périplasma.

Chez *E. coli*, les protéines cytoplasmiques Hsp (heat shock protein) Hsp70, Hsp40, GroEL/GroES assistent le repliement correct des protéines nouvellement synthétisées (Saibil 2013). D'autres chaperonnes sont impliquées dans la réponse spécifique aux stress dans le périplasma. La différence majeure est que l'ATP, la source d'énergie utilisée par les protéines cytoplasmiques, est absente dans le périplasma. De plus, les protéines périplasmiques forment des ponts disulfures grâce à l'action de disulfure isomérases périplasmiques comme DsbA et DsbC (Bardwell *et al.* 1991; Shevchik, Condemine *et al.* 1994). La protéine Spy répond aux stress de l'enveloppe, DegP répond aux stress thermiques HdeA et B répond aux stress acides et UgpB répond aux stress causés par les détergents comme les sels biliaires (Ades *et al.* 2003). Les détergents endommagent les membranes et favorisent l'agrégation de protéines (Urdaneta et Casadesús 2017). La surexpression d'UgpB confère une résistance aux sels biliaires en prévenant l'agrégation de protéines (Lee *et al.* 2020). DegP est une protéase/chaperonne essentielle à la croissance d'*E. coli* à haute température (Lipinska *et al.* 1989). DegP est une chaperonne à basse température, mais devient une peptidase à haute température (heat shock protein) (Spiess *et al.* 1999). Chez *E. coli*, la mutation *degP* est létale à 42°C (Skórko-Glonek *et al.* 1995). DegP est hautement conservée chez les bactéries à Gram-négatif (Pallen et Wren 1997) Elle est impliquée dans la biogenèse d'OMPs partiellement repliées (Krojer *et al.* 2008) En condition de stress acide, les liaisons hydrogène et les ponts salins nécessaires au repliement des protéines ne s'établissent pas correctement. Les chaperonnes HdeA et HdeB sont fonctionnelles à pH 1-3 et pH 4-5 respectivement (Dahl *et al.* 2015). Ces protéines sont utilisées lorsque la bactérie traverse un environnement acide comme l'estomac de l'hôte afin de maintenir l'intégrité des protéines périplasmiques (Mates *et al.* 2007).

10) La synthèse et l'expression de ces protéines chaperonnes sont régulées par les systèmes de détection de stress

L'homéostasie cellulaire dépend en partie de l'intégrité de l'enveloppe. Les bactéries, et donc en premier lieu leur enveloppe, sont exposées aux multiples stress environnementaux. Pour faire face aux dommages causés par ces stress, les bactéries ont développé des systèmes spécifiques dédiés à répondre aux stress de l'enveloppe. Ceux-ci sont généralement activés par l'interaction d'un senseur et d'un régulateur, initiée par le stress subi par l'enveloppe bactérienne (Mitchell *et Silhavy* 2019). Parmi les stress rencontrés par la cellule, on peut citer par exemple la variation des conditions environnementales (température, pH, osmolarité, stress oxydant, milieu oligotrophe), ou bien à la présence de composés toxiques comme les métaux, les antibiotiques, les détergents ou sels biliaires, mais encore les stress intrinsèques comme l'accumulation de métabolites intermédiaires toxiques ou des espèces réactives de l'oxygène (Mitchell *et Silhavy* 2019) (Fig. 1). De plus, les mutations ou les défauts de traduction qui causent le mauvais assemblage des protéines au sein de la cellule, leur mauvais repliement (notamment les OMPs) ou une production déséquilibrée de protéines provoquent également les réactions de stress. Si ces protéines sont adressées à la membrane plasmique, elles sont susceptibles de modifier sa perméabilité et ainsi nuire à l'établissement d'un gradient de protons, source d'énergie dans la cellule (Chao *et Vogel* 2016; Grabowicz *et al.* 2016). L'apparition de stress dans le milieu extérieur est généralement soudain, les cellules doivent adopter une réponse rapide pour maintenir notamment l'intégrité de l'enveloppe.

a. La réponse σ^E

La réponse σ^E concerne principalement les stress de la ME. Le facteur σ^E est lié à une protéine de la MI, le facteur anti-sigma RseA (Fig 11.a.). Cette interaction empêche l'association de σ^E avec l'ARN polymérase (RNAP) et donc la transcription des gènes cibles. Le facteur de stress de l'enveloppe σ^E est activé par l'accumulation d'OMPs mal repliées dans le périplasma et par la production de formes altérées de LPS (Lima *et al.* 2013; Walsh *et al.* 2003). La protéase DegS se lie aux OMPs de la ME mal repliées (Fig 11.a.). DegS clive alors le domaine périplasmique de RseA, ce qui permet à la protéase de la membrane interne RseP d'effectuer un second clivage de RseA dans le domaine transmembranaire, libérant σ^E , ce qui lui permet de s'associer à la RNAP et d'activer son régulon (Fig 11.a.). Les gènes transcrits à partir de promoteurs dépendant de σ^E activent les voies de repliement des OMPs et les facteurs de contrôle de la qualité et diminuent la traduction de nouvelles OMPs, comme les chaperones Skp, SurA, FkpA et DsbC, ainsi que la protéase DegP (Bury-Moné *et al.* 2009; Rhodius *et al.* 2005; Sklar *et al.* 2007; Stull *et al.* 2018).

b. La réponse CpxAR (Conjugative plasmid expression)

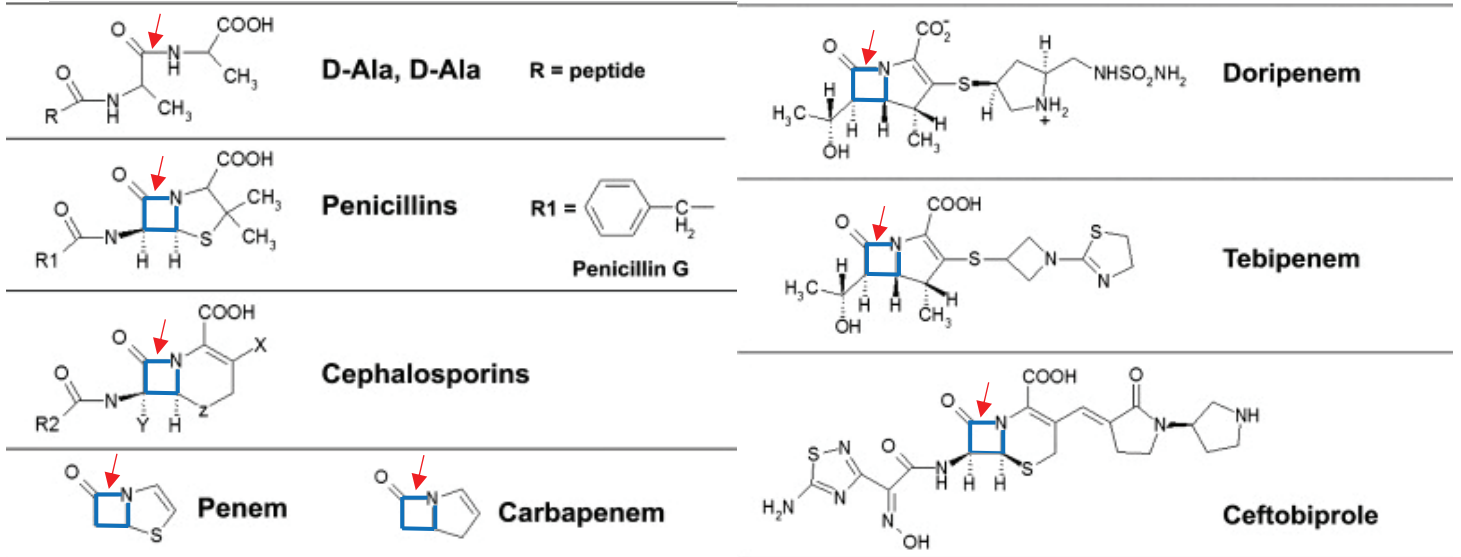
La réponse Cpx est induite par des signaux comprenant un stress de repliement des protéines de la membrane interne et des signaux dépendant de la lipoprotéine NlpE. La réponse Cpx est impliquée dans le maintien de l'intégrité de la paroi bactérienne (Surmann *et al.* 2016). C'est un système à deux composants constitué du senseur histidine kinase CpxA et d'un régulateur CpxR (Fig. 11.b). La protéine

périplasmique CpxP inhibe le système Cpx chez les cellules dans un état normal, en interagissant avec le domaine périplasmique du senseur CpxA (Raivio 2014). La surexpression de CpxP diminue l'activité de la réponse Cpx. La détection des stress induit des modifications structurelles du domaine capteur de CpxA, ce qui entraîne l'autophosphorylation du domaine histidine kinase situé dans le cytoplasme (Fig. 11.b). CpxA phosphoryle ensuite CpxR, le régulateur de la réponse, en l'activant pour la régulation transcriptionnelle. L'un des gènes activés code pour CpxP, qui inhibe l'activation de CpxA et fonctionne dans une boucle de rétroaction négative. La réponse Cpx augmente également l'expression des protéines modifiant le PG, des gènes liés à l'efflux et des gènes liés à l'homéostasie des métaux et de l'oxydoréduction. Le système Cpx régule notamment l'expression des protéines chaperonnes FkpA et DegP (Bury-Moné *et al.* 2009). Surmann et ses collaborateurs ont montré que les protéines impliquées dans la réticulation du PG la L,D-transpeptidase YcbB (LdtD), D,D-carboxypeptidase DacC (une PBP), les amidases AmiA et Slt étaient respectivement 4.69, 3.13, 2.9 et 4.21 fois plus exprimées lors de l'activation du système Cpx (Bernal-Cabas *et al.* 2015; Surmann *et al.* 2016). Plus frappant encore, la L,D-transpeptidase YcfS (LdtC) est 28.7 fois plus exprimée lors de la réponse Cpx. Comme la L,D-transpeptidase YcfS est impliquée dans le couplage de Lpp au PG, le nombre de molécules Lpp attachées au PG augmente lors de l'activation de la réponse Cpx, ce qui en conséquence, augmente la stabilité de la paroi (Surmann *et al.* 2016). Delhaye et ses collaborateurs ont montré que l'activation aberrante de la réponse Cpx par la mutation de *cpxA* engendrait des phénotypes cellulaires particuliers attribués à la surexpression de LdtD, comme des défauts de division cellulaire et une taille irrégulière des cellules bactériennes (Delhaye *et al.* 2016; Pogliano *et al.* 1998).

c. Réponse Rcs (regulator of capsule synthesis)

La réponse Rcs est induite par les défauts de synthèse de PG (Laubacher *et Ades* 2008), les défauts d'adressage de lipoprotéines (Shiba *et al.* 2012) et l'altération de l'intégrité du LPS (Konovalova *et al.* 2016) (Fig. 11.c). RcsF est une lipoprotéine-senseur de 11 kDa insérée à la ME par son extrémité N-terminale, et dont le domaine C-terminal périplasmique sert à la transduction du signal. RcsF interagit avec le régulateur IgaA, localisé à la MI (Fig. 11.c). En condition normale, IgaA réprime l'histidine kinase RcsC ou la phosphotransférase RcsD, empêchant ainsi la phosphorylation du régulateur RcsB (Fig 11.c.). En présence de signaux de stress, RcsF interagit avec IgaA, levant ainsi l'inhibition de RcsC et RcsD. RcsC s'autophosphoryle et phosphoryle RcsD, qui à son tour phosphoryle RcsB, l'activant pour la régulation transcriptionnelle. RcsB, seul ou en tant que dimère avec d'autres régulateurs de réponse tels que RcsA, régule la transcription du régulon Rcs. Par exemple, l'expression des gènes impliqués dans la production de capsule et la formation de biofilms est augmentée, tandis que l'expression des régulateurs de la motilité flagellaire est diminuée (Jozwick *et al.* 2019). Bien que la majorité des lipoprotéines soient périplasmiques et insérées dans le feuillet interne de la MI, RcsF est en partie exposée à la surface de la bactérie (Wall *et al.* 2018). Cela expliquerait comment une lipoprotéine pouvait détecter l'intégrité du LPS. Des expériences de cross-linking suggèrent que RcsF serait également encadrée dans le lumen d'OMPs (Konovalova *et al.* 2014).

A.



B.

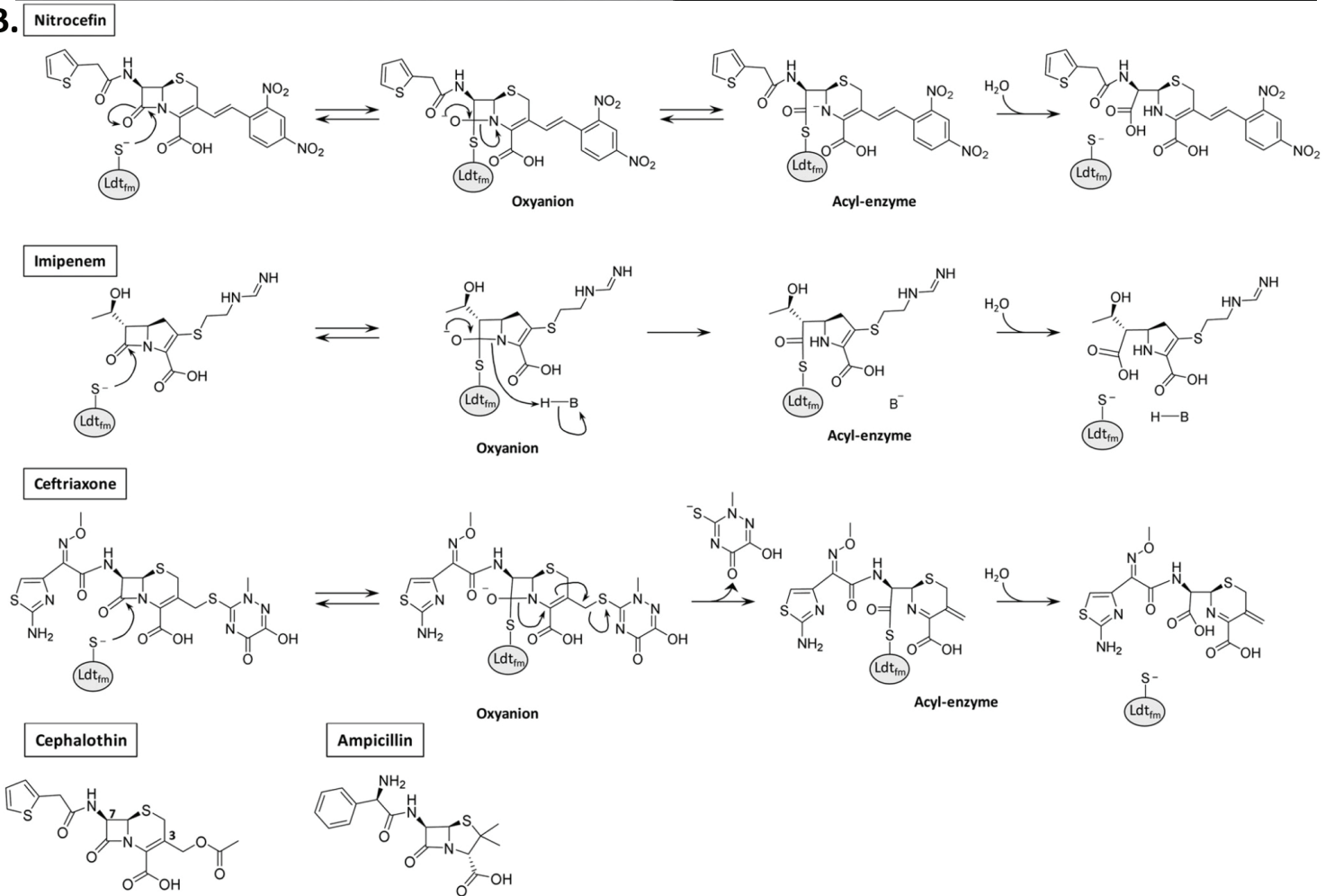


Figure 12. A. Structure chimique des β -lactamines. Le cycle β -lactame, en bleu, formé de quatre chaîons, mime la liaison dipeptide D-Ala⁴-D-Ala⁵ (flèche rouge) du peptide-tige reconnue par les PBP. Les β -lactames agissent comme des inhibiteurs compétitifs des PBPs en liant leur sérine catalytique. Le noyau lactame des pénicillines est relié à un cycle thiazolidine à cinq liaisons (pénème). La chaîne latérale, R, différencie les différentes pénicillines. Chez les céphalosporines, le noyau lactame est lié à un cycle dihydrothiazine à six liaisons (céphème). Un pénème est un type de β -lactame avec un hétérocycle insaturé à cinq liaisons contenant un atome de soufre fusionné au cycle β -lactame. Les carbapénèmes sont apparentés aux pénèmes, mais ont un atome de carbone à la place de l'atome de soufre. Le doripénème et le tébipénème sont des carbapénèmes, tandis que le ceftobiprole est une céphalosporine (Chaudhry *et al.* 2019). **B.** Certaines β -lactamines inhibent les L,D-transpeptidases (Ldt) en se liant à leur cystéine catalytique (Edoo *et al.* 2017). L'acylation des Ldts est réversible. La ceftriaxone et la céphalotine sont des céphalosporines, tandis que l'imipenème est une carbapénème.

d. Réponse BaeSR (bacterial adaptative response)

Bae est un système à deux composants dont BaeS est le senseur et BaeR, le régulateur (Nishino *et al.* 2005) (Fig 11.d.). La réponse Bae est induite par l'exposition des bactéries aux molécules toxiques comme l'éthanol, le zinc et l'indole (Bury-Moné *et al.* 2009; Wang *et Fierke* 2013). La réponse est également activée en condition hyperosmotique (Lin *et al.* 2014). La détection de stress induit l'autophosphorylation de BaeS, qui transfère son groupement phosphate à BaeR, et l'active (Fig. 11.d). BaeSR active l'expression de chaperonnes périplasmiques et de pompes à efflux. Par exemple, la chaperonne Spy (spheroplast protein Y) de 16 kDa est massivement exprimée en réponse à la formation de sphéroplastes (Raffa *et Raivio* 2002) et lors de la disruption de l'enveloppe bactérienne par l'utilisation d'EDTA (déstabilise le LPS par chélation des cations Mg^{2+}) ou du lysozyme (dégradation du PG) (Hagenmaier *et al.* 1997). Des homologues de Spy sont présents chez de nombreuses protéobactéries et cyanobactéries (Quan *et al.* 2011).

e. Réponse Psp (phage shock protein)

La réponse Psp est activée lors de dommages importants de la MI (Fig 11.e.). Le système Psp a été identifié comme une réponse à l'infection d'*E. coli* par des phages, durant laquelle la protéine de 25 kDa PspA était surexprimée (Brissette *et al.* 1990). Le promoteur de la transcription PspF est inhibé dans des conditions non inductrices par une interaction physique avec PspA (Fig. 11.e). Dans des conditions d'activation, les protéines de la MI PspB et PspC interagissent avec PspA, ce qui libère PspF. PspF est une protéine qui interagit avec l'ARN polymérase contenant σ^N (le facteur sigma de régulation de l'azote), ce qui augmente la transcription des gènes *psp*. En plus de séquestrer PspF, PspA est retrouvé dans la MI, où son oligomérisation en 36 sous-unités permettrait de prévenir la fuite de protons à travers la membrane. Le mutant *pspA* possède des phénotypes symptomatiques d'une PMF altérée, comme une translocation de protéines plus lente à travers la MI, et un taux de survie réduit en phase stationnaire à pH élevé (Kleerebezem *et al.* 1996; Weiner *et Model* 1994). PspA est codée par l'opéron *pspABCDE*, dont l'expression est contrôlée par la protéine régulatrice PspF. Les protéines PspBC forment un complexe à la MI et forment une cascade de transduction du signal entre la MI et le cytoplasme. Plus largement, il détecte des défauts de perméabilité de la MI (Flores-Kim *et Darwin* 2016). En effet, l'activation de la réponse Psp résulte de la perte de la force proton motrice (PMF) associée à l'altération de l'intégrité de la MI (Brissette *et al.* 1990).

Les sécrétines sont capables d'induire la réponse Psp car elles forment des pores constitutivement ouverts, comme les porines (Disconzi *et al.* 2014). Par exemple, en absence de la pilotine-chaperonne PulS, la sécrétine PulD s'assemble dans la MI, causant une fuite de protons induisant la réponse Psp chez *Klebsiella pneumoniae* (Guilvout *et al.* 2006). Zhang et collaborateurs ont toutefois montré que la surexpression de la protéine d'échafaudage OutB chez un mutant de la pilotine OutS permettait de diminuer la réponse Psp, malgré la localisation aberrante de la sécrétine à la MI (Zhang *et al.* 2022).

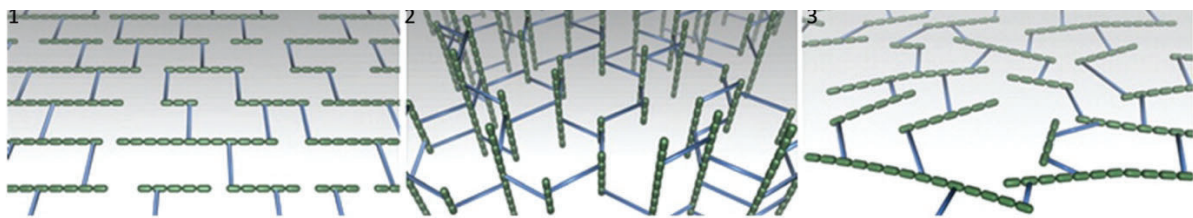


Figure 13. Modèles d'organisation du PG dans les parois bactériennes. **A gauche**, « en couche, ou layered » : les chaînes de glycane sont parallèles à la surface de la cellule, **au milieu**, « en échafaudage, ou scaffold » : les chaînes de glycane sont perpendiculaires à la surface de la cellule, **à droite**, « en couches désorganisées ou disorganised layered » : les chaînes de glycane sont orientées aléatoirement les unes par rapport aux autres. Les disaccharides composant la chaîne de glycane sont représentés en vert et les peptides-tiges sont représentés en bleu. D'après Gan *et al.* 2008.

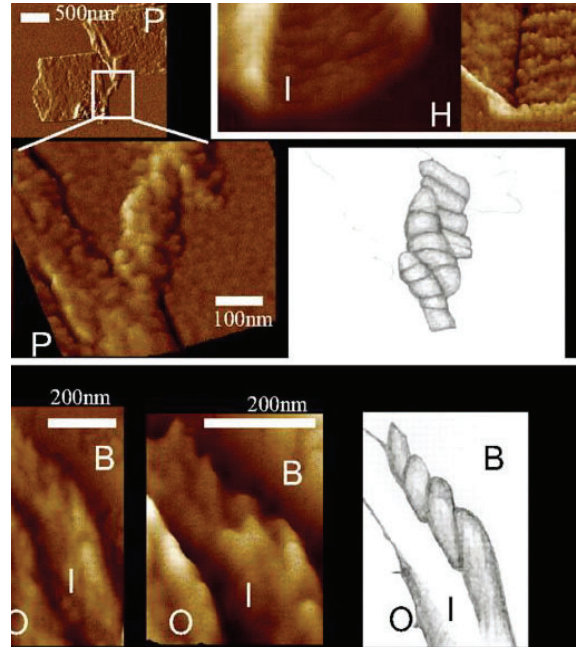
II) Structure du saccule, ou l'architecture du PG

Le PG est le constituant majoritaire de la paroi bactérienne. C'est un polymère de disaccharides d'acide N-acétylmuramique (MurNac ou NAM) et de N-acétylglucosamine (GlcNac ou NAG), reliés entre eux par une liaison osidique de type β -1,4. La succession de disaccharides forme des chaînes de glycanes (Vollmer, Blanot, *et al.* 2008) (Fig. 4). Les MurNac sont reliés à de courts peptides de cinq acides-aminés (L-Ala¹, D-Glu², mDAP³, D-Ala⁴, D-Ala⁵ chez *E. coli*) qui sont attachés au groupe D-lactate, lui-même attaché en position C3 par une liaison éther. Les peptides-tiges de chaînes de glycanes adjacentes sont attachées entre eux pour créer un réseau de PG en forme de sac entourant la cellule, appelée saccule. Le saccule est considéré comme un exosquelette qui confère une forme à la cellule bactérienne et la protège de la lyse dans un milieu hypertonique. Toutefois, le PG possède une structure permettant de détendre et d'étirer le PG afin d'assurer la souplesse et l'élasticité de la paroi bactérienne au cours de la vie de la cellule. Les modélisations moléculaires suggèrent que les chaînes de glycanes qui composent le PG sont rigides alors que les peptides-tiges confèreraient la flexibilité de la structure (de Pedro *et Cava* 2015). De plus, l'agencement de courtes chaînes de glycanes favoriserait également la flexibilité et une meilleure tolérance à la déformation de la structure du PG. Les techniques actuelles ne permettent pas de déterminer l'architecture exacte du saccule (Vollmer *et Seligman* 2010). Néanmoins, quelques modèles de la structure tridimensionnelle du PG ont été proposés (Pokhrel *et al.* 2022; Vollmer *et Seligman* 2010).

1) Modèles d'organisation du PG, structure tridimensionnelle

Les observations des saccules par cryo-TEM ou par AFM et la mesure de ses paramètres mécaniques ont permis de proposer trois modèles d'organisation tridimensionnelle du PG. Premièrement, le modèle le plus accepté par la communauté scientifique est une organisation du PG « en couches » ou « layered » (Fig. 13). Ce modèle propose que les chaînes de glycanes sont parallèles à la membrane plasmique. En 2008, Gan et ses collègues ont proposé un modèle basé sur des observations des saccules de *C. crescentus* en cryo-EM dans lequel les chaînes de glycanes seraient assemblées parallèlement à la membrane cytoplasmique (Gan *et al.* 2008). Les chaînes de glycanes devraient adopter une conformation hélicoïdale droite, avec un pas de 3 ou 4 disaccharides par tour (Gumbart *et al.* 2014). Dans ce modèle, les peptides-tiges pointeraient alternativement dans 3 à 4 directions différentes. La moitié de ceux-ci seraient dans le plan de la chaîne de glycanes, tandis que les autres seraient orthogonaux et disponibles pour la réticulation « en couches » superposées avec des chaînes de glycanes voisines. Le second modèle est étayé par des simulations informatiques, mais n'a jamais été vérifié expérimentalement. Deuxièmement, un modèle appelé « échafaudage » ou « scaffold », propose que les chaînes glycanes sont perpendiculaires à la membrane plasmique (Fig. 13). Ce modèle est incompatible avec l'épaisseur du PG des bactéries à Gram-négatif (3 à 6 nm), puisque la taille moyenne des chaînes de glycanes est de 21 résidus, soit ~22 nm (Gan *et al.* 2008). Enfin, le modèle alternatif « désorganisé » ou « disorganized » propose que les chaînes glycanes seraient agencées de manière beaucoup plus hétérogène que les deux modèles précédents. L'observation du PG d'*E. coli* par AFM, a montré que les chaînes de glycanes d'un mutant sphérique *mreB* sont plus courtes et plus désorganisées (Turner *et al.* 2018). Chez la souche sauvage en revanche,

A.



B.

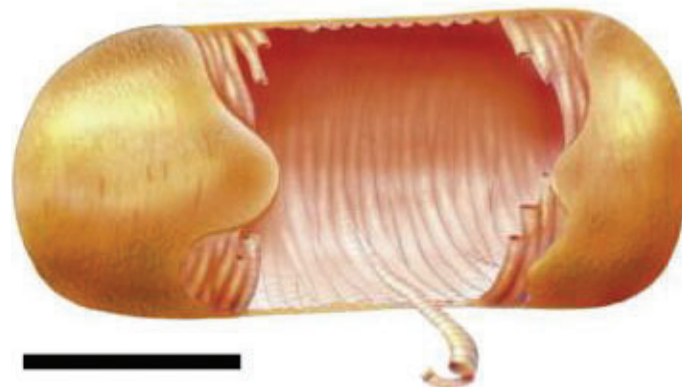


Figure 14. Peptidoglycane de *Bacillus subtilis* observé en AFM. A. Des structures 'coiled-coil' de 50 nm de largeur formées par des fibres de 25 nm de largeur, sont observables dans le saccule de *B. subtilis*. Ces observations ont suggéré que le PG de certaines bactéries à Gram + pouvait posséder une structure d'ordre supérieur en câbles enroulés autour de l'axe long de la bactérie. D'après Hayhurst *et al.* 2008.

les chaînes de glycanes sont parallèles à la membrane cytoplasmique, plus organisées car alignées les unes aux autres. Ces observations suggèrent que les contraintes qu'exerce la pression osmotique du cytoplasme sur le PG pourrait être responsable de sa structure telle qu'observée en microscopie.

Le PG des bactéries à Gram-négatif, mono- ou multicouche ?

Le caractère multicouche du PG des bactéries à Gram-positif est généralement bien admis, en raison de son épaisseur allant jusqu'à 50 nm (Tableau 1). Cette affirmation est néanmoins moins sûre concernant le PG des bactéries à Gram-négatif n'excédant généralement pas les 6 nm (Tableau 2). Les observations du PG d'*E. coli* par SANS ont suggéré que celui-ci était principalement une monocouche d'une épaisseur de 2.5 nm (Labischinski *et al.* 1991). Néanmoins, la présence de régions de PG plus épaisses (6 nm), représentant 25 % de la surface totale de la bactérie, est compatible avec l'agencement local du PG en trois couches. Un argument appuyant cette théorie est que les peptides-tiges de chaînes glycanes peuvent s'associer en trimères ou en tétramères (Fig. 18.B). Gan et ses collaborateurs sont plus pessimistes vis-à-vis de cette théorie, puisqu'ils ont observé que le PG de *Caulobacter crescentus* était d'une épaisseur uniforme (4 nm), ce qui est compatible avec l'hypothèse d'une monocouche de PG. Les auteurs proposent que les observations de Labischinski étaient faussées par l'agrégation de saccules (Gan *et al.* 2008). Il est néanmoins tout à fait possible que chaque espèce bactérienne possède une architecture ou une épaisseur de PG qui lui est propre (Vollmer, Blanot, *et al.* 2008). En effet, l'épaisseur du PG d'*E. coli* et de *P. aeruginosa* varie sensiblement (3 à 7 nm, contre 2.5 à 3 nm pour *P. aeruginosa*), alors même que la composition chimique de PG est similaire (Quintela *et al.* 1995), et qu'elles soient toutes deux des γ -protéobactéries.

Les bactéries à Gram-positif possèdent-elles un PG « coiled-coil » ?

Chez les bactéries à Gram-positif, la couche d'acides téichoïques apparaît lisse et régulière par AFM ; elle empêche de visualiser le PG sous-jacent (Andre *et al.* 2010). C'est pourquoi seul le PG des mutants dépourvus d'acides téichoïques peut être étudié. Ainsi, les observations du PG de *B. subtilis* (Hayhurst *et al.* 2008) et de *Lactococcus lactis* (Andre *et al.* 2010) par AFM ont révélé que des chaînes de glycanes étaient organisées en structures particulières 'coiled-coil' (Fig. 14.A). Ces structures seraient formées par des fibres de 25 nm de largeur qui s'enroulent en câbles de 50 nm de largeur parallèlement à l'axe court de la cellule, avec une périodicité de 25 nm. L'enroulement des câbles de PG autour de la circonférence de la cellule serait dû au mouvement circonférentiel des filaments MreB qui guident le mouvement de l'élongasome (Dion *et al.* 2019; Domínguez-Escobar *et al.* 2011; Pasquina-Lemonche *et al.* 2020). Toutes les bactéries à Gram-positif ne possèderaient pas de telles structures, puisqu'une taille minimale de chaînes glycanes est requise pour les former. En effet, les chaînes de glycanes de 6 unités disaccharidiques de *S. aureus* seraient incompatibles avec cette structure coiled-coil. Tandis que l'étonnante longueur des chaînes de glycanes de *B. subtilis* (5000 unités disaccharidiques $\sim 5 \mu\text{m}$) serait compatible avec cet arrangement (Hayhurst *et al.* 2008).

A l'heure actuelle, les techniques de microscopie ne possèdent pas une résolution suffisante pour observer les chaînes de glycanes ou des peptides-tiges. L'observation de cellules vivantes est encore

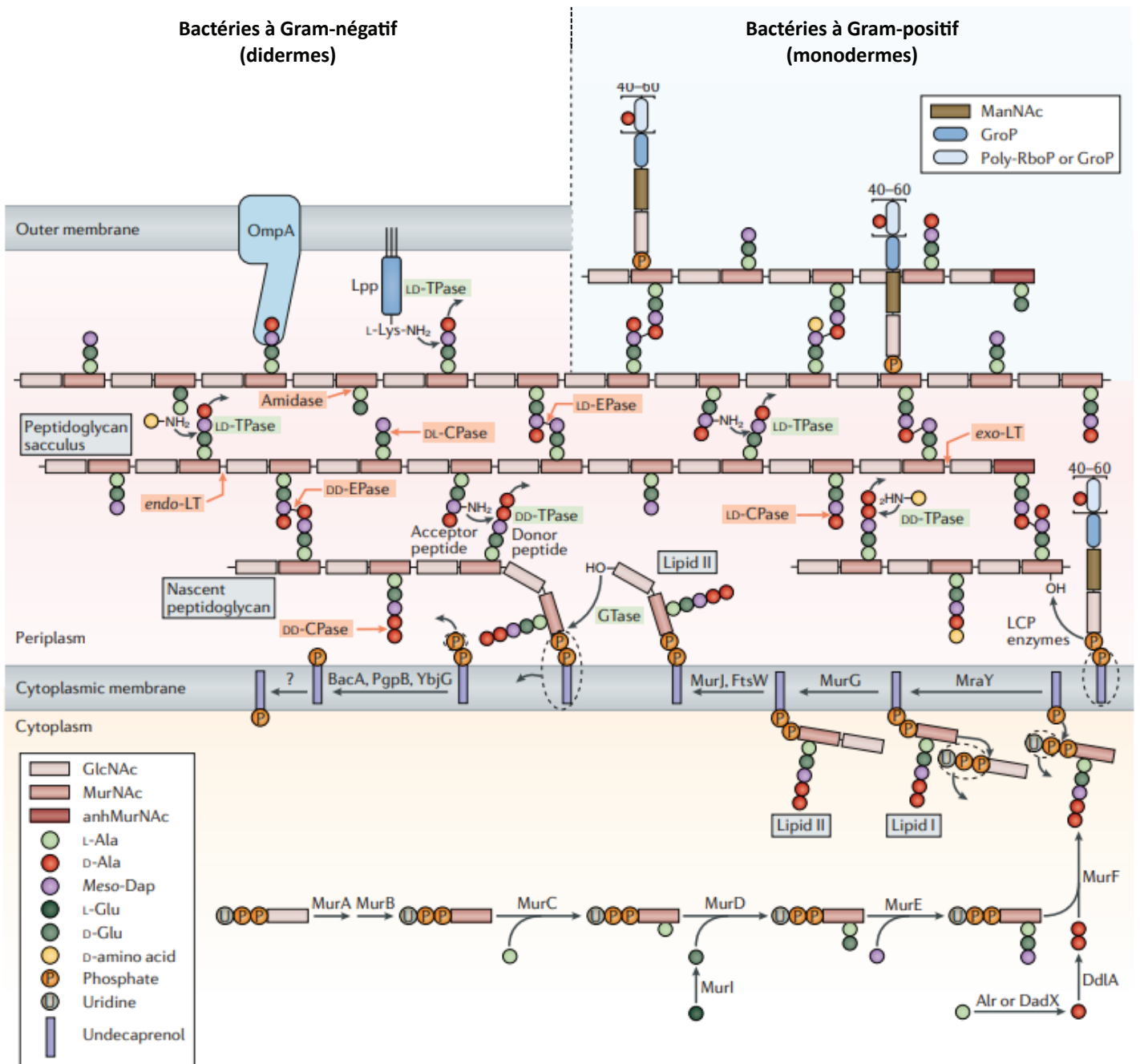


Figure 15. Régulation de la synthèse de PG. Les premières étapes de la synthèse du PG se déroulent dans le cytoplasme, et aboutissent à la synthèse du lipide II, ancré dans la face interne de la MI. Le lipide II est ensuite retourné du côté périplasmique de la MI par la flipase MurJ. Le lipide II est ensuite additionné aux chaînes de glycanes du PG existant par des glycosyltransférases. Puis, les chaînes de PG sont réticulées par des D,D-transpeptidases (DD-TPases). D'après Egan *et al.* 2020.

limitée à leur surface externe, mais l'AFM permet désormais d'accéder à la structure interne des saccules isolés (Pasquina-Lemonche *et al.* 2020).

2) Propriétés mécaniques et topographie du saccule

Les propriétés mécaniques du réseau macromoléculaire que constitue le saccule sont encore mal comprises. C'est la conséquence de la complexité et la variabilité de sa structure tant au niveau de sa composition qu'au niveau de son organisation (orientation des chaînes de glycane et des peptidestiges). Les propriétés mécaniques du PG, telles que son élasticité et sa déformabilité sont influencées par l'épaisseur de la couche de PG, sa composition, sa densité et son degré de réticulation.

a. Élasticité

Les nouvelles techniques d'analyse ont permis d'étudier le comportement mécanique du PG. L'AFM (microscopie à force atomique) est une technique qui repose sur la détection d'une surface à l'aide d'une pointe pyramidale en nitrure de silicium montée sur un levier flexible. La déviation du levier est mesurée lorsque la pointe parcourt l'échantillon. L'apex de la pointe, d'une taille nanométrique, permet de déterminer la topographie d'un objet d'une taille aussi petite que 100 nm. L'analyse de la déviation par laser permet de déterminer le trajet exact de la pointe et de mesurer la force d'interaction entre la pointe et l'échantillon. Dans le domaine de la microbiologie, cette technique est utilisée pour déterminer la topologie de la surface bactérienne ou encore pour mesurer les forces d'adhésions entre la pointe et l'échantillon afin de quantifier l'élasticité de la surface cellulaire. C'est grâce à cette technique que le module d'élasticité du PG (ou module de Young) a pu être déterminé. Celui-ci traduit les contraintes mécaniques nécessaires pour étendre la longueur initiale d'un matériau à 100 %. Yao et ses collaborateurs ont alors démontré que le module de Young d'*E. coli* était de 25 MPa. Lors de son expérience, la bactérie a pu être étirée de 1,8 sa taille initiale le long de l'axe longitudinal (Yao *et al.* 1999). Les auteurs ont également noté que l'élasticité de la structure variait en fonction du pourcentage d'hydratation du PG.

b. Taille des pores

Le PG est une structure dont la densité est localement interrompue par la présence de pores. L'alternance de chaînes de glycanes et de peptidestiges confère au PG une structure moléculaire analogue à celle d'un filet de pêche. La taille des pores peut être déterminée par l'étude de la diffusibilité des molécules marquées à la fluorescéine à travers de la couche de PG. Pour cela Demchick et Koch ont utilisé des molécules de dextran de taille variable marquées à la fluorescéine (Demchick et Koch 1996). Les auteurs ont ainsi pu déterminer que chez *E. coli* et *B. subtilis*, la taille des pores était respectivement de 2,06 et 2,12 nm. Du fait de l'élasticité du PG, il a été supposé que des molécules d'un poids moléculaire atteignant 22 à 24 kDa pouvaient traverser un PG détendu, alors que des molécules de poids moléculaire allant jusqu'à 50 kDa pouvaient passer les pores d'un PG étiré (Vollmer, Blanot, *et al.* 2008). Une autre étude a montré qu'en conditions de choc osmotique, des molécules de

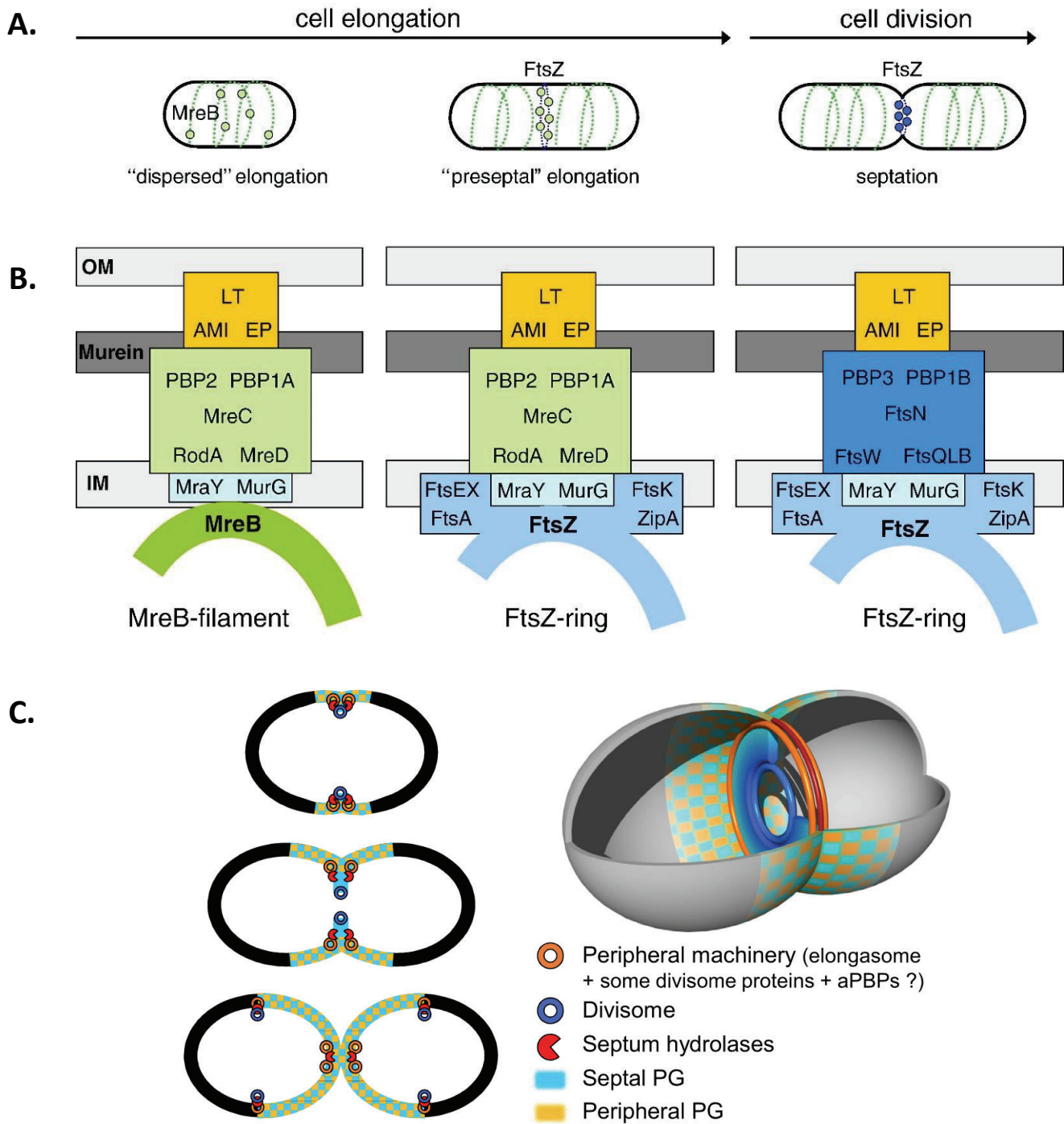


Figure 16. Modèles temporels et spatiaux de l'organisation des complexes de synthèse du PG. **A.** Chez les bacilles, le PG latéral est synthétisé par des complexes de synthèse appelés élongasomes (cercles verts) associés aux filaments de l'actine MreB (ligne verte en pointillés). La formation de l'anneau FtsZ (avec d'autres protéines de division cellulaire précoce, ligne bleue en pointillés) redirige les complexes d'élongation vers le milieu de la cellule, ce qui entraîne une élongation préseptale au milieu de la cellule. La constriction commence une fois que les complexes d'élongation ont été remplacés par les complexes de synthèse spécifiques de la division cellulaire (cercles bleus), appelés divisomes associés à FtsZ. **B.** Composition de l'élongasome, du divisome et du complexe intermédiaire pour les différents modes de croissance. D'après Vollmer *et al.* 2008. **C.** Chez les bactéries ovoïdes comme, *Streptococcus pneumoniae*, l'élongasome et le divisome sont situés sur le plan médian de la cellule et fonctionnent simultanément dès le début du cycle cellulaire. D'après Trouve *et al.* 2021.

100 kDa pouvaient traverser le PG d'*E. coli* (Vázquez-Laslop *et al.* 2001), ce qui correspondrait à une taille de pore de 3,1 nm (Vollmer *et Höltje* 2004). Plus récemment, des pores encore plus grands de 13 nm de diamètre ont été détectés par AFM aux pôles de la bactérie à Gram-négatif *Pseudomonas aeruginosa*. Cette taille de pore serait compatible avec les événements de remodelage local que subit le PG afin de laisser passer des systèmes multiprotéiques comme les systèmes de sécrétion ou les pili. La visualisation de la structure du PG de *B. subtilis* et de *S. aureus* par AFM a récemment permis d'identifier des pores dont le diamètre mesure jusqu'à 60 nm (Pasquina-Lemonche *et al.* 2020). Cette même étude montre que la zone correspondant à la face interne du PG est plus dense que la face externe du PG, ce qui provoque une diminution du diamètre du pore à mesure qu'il progresse dans la face interne. De plus, la répartition des pores n'est pas homogène à la surface de la cellule. En effet, le PG septal est plus dense que le PG latéral (Pasquina-Lemonche *et al.* 2020). Cela se visualise par une démarcation franche au niveau du PG septal, témoignant de la densification des mèches de PG. Ces mèches denses et circulaires correspondent au PG naissant au septum. En conséquence, la densification du PG diminue visiblement le nombre de pores à la surface de celui-ci. Les contraintes importantes que subit le PG en raison de la courbure prise localement par les chaînes de glycanes pourraient expliquer la nécessité de densifier et de renforcer le PG dans cette zone spécifique afin d'éviter la lyse de la cellule.

3) Synthèse du PG

La synthèse et l'assemblage du PG est un processus complexe qui implique 11 enzymes. Les premières étapes de ce processus se déroulent dans le cytoplasme (Fig. 15). Elles aboutissent à la synthèse d'un précurseur de PG : le disaccharide GlcNac-MurNac-pentapeptide appelé lipide II. Après sa synthèse dans le cytoplasme, le lipide II est transloqué à travers la MI dans le périplasma, où il est assemblé au PG existant, permettant l'élongation de la paroi bactérienne. Le mécanisme de synthèse du PG est partagé par les bactéries à Gram-négatif et les bactéries à Gram-positif. La majorité des enzymes essentielles à la synthèse du PG sont connues depuis longtemps, mais la compréhension de la complexité des mécanismes moléculaire sous-jacents reste encore limitée (Egan *et al.* 2020).

a. Première étape : Synthèse du lipide II

La première étape consiste en la synthèse d'UDP-MurNac dans le cytoplasme à partir d'un précurseur d'UDP-GlcNac par l'action des enzymes MurA et MurB (Fig. 15). Les trois premiers acides aminés composant le peptide-tige (L-Ala¹, D-Glu², mDAP³) sont ensuite additionnés au groupement D-lactate en C3 du MurNac par les ligases MurC, MurD et MurE (Fig. 15). Le dipeptide D-Ala, D-Ala est synthétisé par la D-alanine-D-alanine ligase (Ddl), puis additionné au tripeptide existant par la ligase MurF pour former un pentapeptide (L-Ala¹, D-Glu², mDAP³, D-Ala⁴, D-Ala⁵) (Fig. 15). L'étape suivante consiste en la formation du lipide I : le MurNac-pentapeptide-tige est transféré par MraY à sur un lipide de 55 carbones (undécaprényl-phosphate) ancré à la MI. Le lipide II est ensuite formé par la transférase MurG, qui réalise l'addition du GlcNac au lipide I, pour former un GlcNac-MurNac-pentapeptide ancré à la membrane par le lipide undécaprényl-phosphate (Fig. 15). Finalement, le lipide

Il est retourné par la flippase MurJ et FtsW de l'autre côté de la MI, dans le périplasme (Gram-négatif) ou le milieu extérieur (Gram-positif). Ici, le lipide II est pris en charge par des transglycosylases chargées d'incorporer le disaccharide-pentapeptide à la chaîne de glycanes existant par transglycosylation (Fig. 15). Présent en faible nombre de copies par cellules, le lipide undécaprényl-phosphate est ensuite recyclé par la phosphatase BacA et retourné dans la face cytosolique de la membrane afin de reprendre le cycle de synthèse.

b. Les complexes protéiques impliqués dans la synthèse du PG et la division bactérienne : l'élongasome et le divisome

L'élongasome et le divisome sont les complexes protéiques responsables de la synthèse de PG pendant l'élongation et la division cellulaire respectivement (Szwedziak *et Löwe* 2013) (Fig. 16). Chez les bacilles, ces systèmes n'occupent pas spatialement la même région que le divisome, et leurs fonctionnements sont temporellement distincts. En effet, le divisome est présent au niveau du site de division (Fig. 16). Il est responsable de la constriction de la ME et de la MI, et de la synthèse du PG lors de la division cellulaire. Son action permet la mise en place de deux nouveaux pôles cellulaires. L'élongasome est présent à plusieurs endroits de la cellule le long des filaments de MreB (Fig. 16). Chez les bactéries sphériques en revanche, l'élongation et la division cellulaire ont lieu dans région restreinte en forme d'anneau au milieu de la cellule (Trouve *et al.* 2021). La dynamique de la machinerie de division/insertion de PG est différente de celle des bactéries en forme de bacille. En effet, la synthèse du PG septal est initiée dès le début du cycle cellulaire par le divisome et que le PG latéral est constamment remodelé le long du cycle cellulaire, de sorte qu'il soit constitué d'une alternance de PG septal synthétisé par le divisome et de PG latéral synthétisé par l'élongasome (Trouve *et al.* 2021). Ainsi, chez les bactéries sphériques, le fonctionnement de l'élongasome et du divisome n'est ni spatialement, ni temporellement distinct (Trouve *et al.* 2021) (Fig. 16).

Le divisome et l'élongasome partagent une plateforme protéique similaire composée des protéines SEDS (shape, elongation, division and sporulation) interagissant avec le complexe de synthèse du lipide II (Szwedziak *et Löwe* 2013). Les bacilles modèles *E. coli* et *B. subtilis*, possèdent tous les deux les protéines SEDS RodA et FtsW, essentielles pour la croissance du saccule durant l'élongation et la division (Fig. 16). Toutefois, les protéines composant le divisome et l'élongasome ne sont pas exactement les mêmes. Par exemple, le divisome est composé des PBP1b et PBP3, alors que l'élongasome est composé de PBP1A et PBP2 (Fig. 16). De plus, une des différences majeures entre les deux systèmes réside dans la nature des structures associées à la membrane cytoplasmique : MreB, homologue bactérien de l'actine pour l'élongasome, et FtsZ, homologue de la tubuline pour le divisome (Barton, *et al.* 2021; Margolin 2005) (Fig. 16). Chez la majorité des bactéries à Gram-négatif et à Gram-positif, les complexes d'élongasome sont situés le long du PG latéral, ce qui permet l'insertion simultanée de PG à différents sites du PG. En revanche, chez les Mycobactéries, l'élongasome, comme le divisome, est situé aux pôles de la bactérie (Kieser *et Rubin* 2014). Par ailleurs, les mycobactéries ont une division asymétrique, tandis que les bactéries à Gram-négatif et à Gram-positif ont une division symétrique. En conséquence, les cellules filles issues d'une Mycobactérie ne

possèdent pas exactement la même composition en couplages 3→3 et 4→3 après division (Kieser *et Rubin* 2014).

c. Chez les bactéries à Gram-négatif, la synthèse de la paroi n'est pas indispensable à l'expansion de la surface bactérienne.

La croissance de l'enveloppe bactérienne est généralement attribuée à l'insertion de PG à la paroi durant la phase de croissance, du fait de la capacité PG à supporter des contraintes mécaniques. Cependant, Oldewurtel et ses collègues ont montré que la croissance de l'enveloppe est indépendante de l'insertion du PG dans la paroi bactérienne (Oldewurtel *et al.* 2023). Pour cela, les chercheurs ont utilisé la D-cyclosérine, un homologue de la D-Alanine, interférant avec la conversion enzymatique de la L-alanine en D-alanine. La D-cyclosérine empêche, de fait, la formation du peptide-tige, et donc, la synthèse du PG. Les résultats montrent que l'enveloppe des cellules continue de croître à un rythme normal corrélé à la biomasse disponible pour la croissance bactérienne, et ce, malgré l'arrêt total de l'insertion du PG dans la paroi. L'absence de paroi mène cependant à la lyse de la cellule. De plus, les auteurs montrent que l'action de la D,D-endopeptidase MepS accélère l'élongation de l'enveloppe bactérienne. Ces résultats montrent que les forces exercées sur l'enveloppe peuvent guider l'expansion cellulaire.

4) Méthodes d'analyse de la composition du PG

Les techniques d'analyse du PG en spectrométrie de masse permettent de déterminer la composition moléculaire du PG et son degré de réticulation, la longueur des chaînes de glycanes, ainsi que la composition des peptides-tiges (Schaub *et al.* 2016). La technique d'identification des muuropeptides par spectrométrie de masse, développée par Glauner en 1988, est encore aujourd'hui largement utilisée pour déterminer la composition du PG d'une espèce bactérienne (Glauner 1988). La première étape consiste en la purification des sacculs de PG à partir de cellules bactériennes. Tout d'abord, les membranes et les protéines sont solubilisées par ébullition dans du SDS, puis les protéines contaminantes et le SDS sont éliminés par des lavages successifs. S'en suit la digestion des sacculs par des muramidases digérant le PG en unités appelées muuropeptides. Ces derniers sont séparés par HPLC en phase inverse, puis analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF ou par spectrométrie de masse en tandem (Bern *et al.* 2017). Bien que fonctionnelle, cette méthode possède quelques inconvénients majeurs. L'identification et l'assignement des ions produits de MS à la structure du muuropeptide correspondant est manuelle et, par conséquent, subjective et coûteuse en temps. L'analyse manuelle nécessite d'une part l'intervention de personnel qualifiée, et d'autre part, elle peut être biaisée par la détection préférentielle de composés connus, identifiés précédemment et/ou majoritaires, au détriment d'éventuels nouveaux composants minoritaires. En conséquence, cela limite l'appréciation de la diversité du PG (Anderson *et al.* 2020). Plus récemment, certains groupes de recherche ont automatisé l'identification des ions produits par MS à haute résolution grâce à l'utilisation de logiciels d'extraction d'éléments capables de prendre en charge des données complexes (par exemple le programme Byonic, un logiciel d'identification de peptides (Bern *et al.* 2012; van der Aart *et al.* 2018;

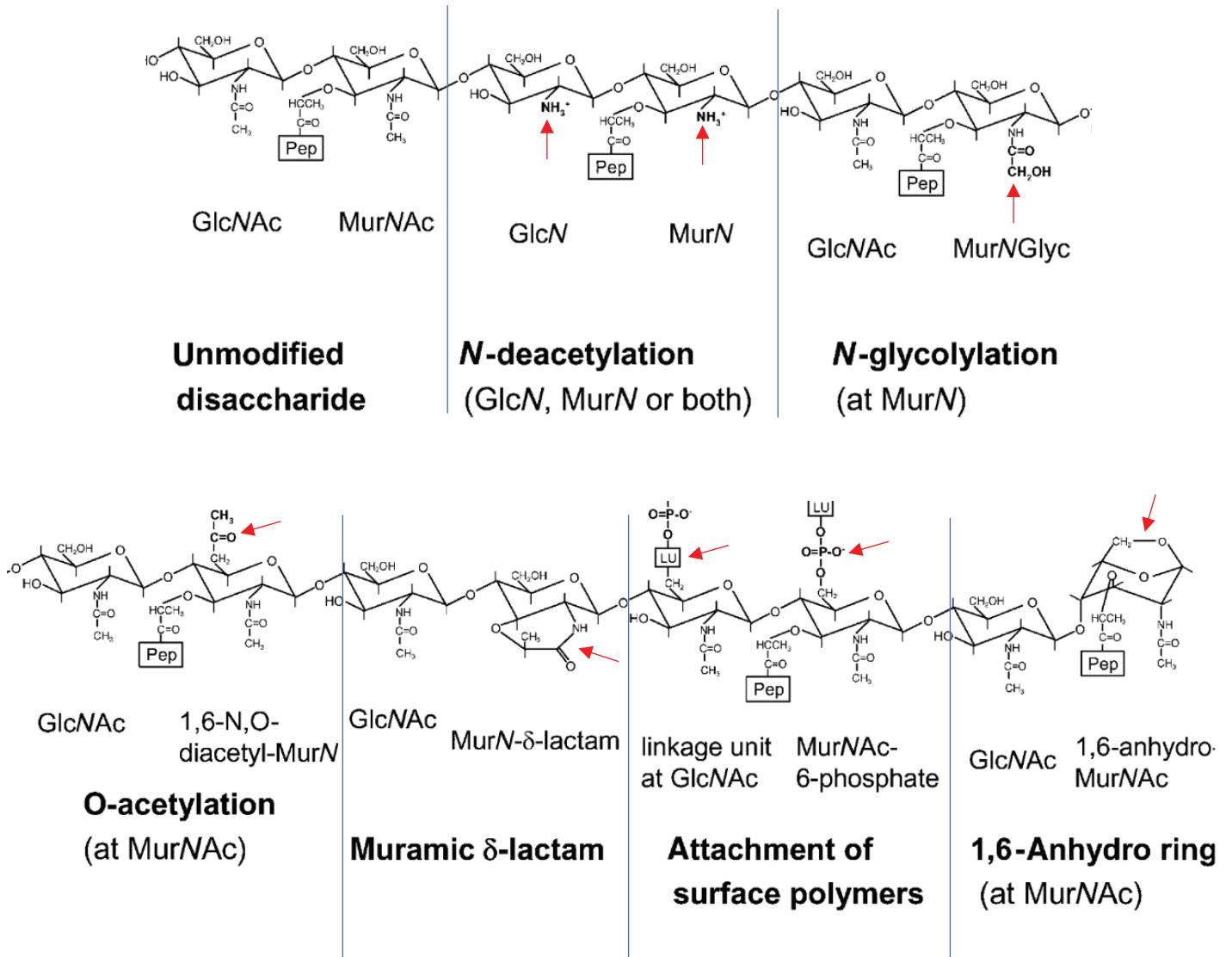


Figure 17. Modification des saccharides de la chaîne de glycanes. Les chaînes de glycanes sont composées d'une alternance de disaccharides GlcNAc, MurN. Les saccharides de la chaîne de glycanes peuvent subir des modifications chimiques durant la maturation du PG ; à savoir des O-acétylations, des N-désacétylation, des N-glycolylation, des cyclisations ou encore l'attachement de polymères de surface. D'après Vollmer 2008.

Anderson *et al.* 2020; Bern *et al.* 2017; Patel *et al.* 2021). Ces approches, qualifiées de « peptidoglycomics », permettent l'analyse haut-débit et automatisée (à l'exception de la détermination manuelle des couplages 3→3 et 4→3) de la composition du PG par MS/MS. Plus précise, cette approche permet la comparaison fine de la composition du PG *in vivo*. A titre d'exemple, l'utilisation de matériel approprié (une séparation nano-LC combinée à un spectromètre de haute précision) permet l'analyse en moins d'une heure de quantité de PG issu d'un faible nombre de cellules (10⁴ cellules) (Bern *et al.* 2017). Cette nouvelle approche a permis d'étendre la connaissance de la diversité de composition du PG chez les bactéries à Gram-positif *Enterococcus faecalis*, *Clostridium difficile* (Bern *et al.* 2017), chez les Mycobactéries (Rimal *et al.* 2022). Elle a également révélé des modifications du peptide-tige jamais encore détectées par les études antérieures chez la bactérie à Gram-négatif *Pseudomonas aeruginosa* (Anderson *et al.* 2020) avec notamment la découverte de peptides-tige ayant une composition non-canonique, possédant par exemple des arginines, glycines et sérines en 4^e et 5^e position du peptide-tige (Anderson *et al.* 2020).

5) Diversité des chaînes de glycanes

a. Longueur des chaînes de glycanes

Les chaînes de glycanes sont constituées d'une répétition stricte de disaccharides GlcNac-MurNac (Vollmer, Blanot, *et al.* 2008). Elles sont reliées entre elles par des ponts interpeptidiques covalents, qui assurent ensemble la cohésion des chaînes de glycanes en une structure d'ordre supérieur appelée saccule. Ce chapitre expose la structure et la composition de la chaîne de glycane, ainsi que ses variations connues. On estime qu'*Escherichia coli* possède 3,5 x 10⁶ muopeptides (unité disaccharidique peptide-tige) par cellule (Wientjes *et al.* 1991). Un disaccharide mesure environ 1.03 nm (Carlstrom 1957). Les premiers concepts de la paroi en 1960 proposaient que des chaînes de glycanes, composées d'une répétition infinie de disaccharides, s'étendaient tout le long de la cellule (Rogers 1970). Or, les méthodes actuelles permettent d'isoler les chaînes de glycanes par digestion du PG par des amidases qui libèrent le peptide-tige de la chaîne de glycane. La chaîne de glycane est ensuite séparée en fonction de son poids moléculaire par chromatographie échangeuse de cation, puis par chromatographie d'exclusion. L'analyse conséquente des chaînes de glycanes par HPLC-MS montre que non seulement celles-ci sont de longueur finie, mais qu'en plus, leur longueur est variable selon les espèces bactériennes. Chez les bactéries à Gram-positif, une grande variabilité de la taille des chaînes de glycanes peut être observée. L'étude par HPLC chez *S. pneumoniae* et chez *S. aureus*, révèle une longueur moyenne des chaînes de glycanes de 50 et 6 unités disaccharidiques respectivement (Turner *et al.* 2010). L'étude du PG de *Bacillus subtilis* par HPLC-MS a mis en évidence la présence de chaînes de glycanes composées de 500 unités disaccharidiques (Hayhurst *et al.* 2008). L'étude du PG par AFM a quant à elle mesuré des chaînes de glycanes composées de 5000 unités disaccharidiques. Ce qui correspondrait à une chaîne mesurant jusqu'à 5 µm de longueur, soit une longueur supérieure à la cellule elle-même (Hayhurst *et al.* 2008). Cette différence de résultats pourrait s'expliquer par la technique employée : les méthodes de séparation par HPLC limitent généralement l'identification de longs polymères de disaccharides (Harz, Burgdorf, et Höltje 1990). Les mêmes auteurs ont montré que 69.3 % des chaînes de glycanes d'*E. coli* possédaient entre 1 et 30 unités disaccharidiques, tandis que

30.7 % des chaînes étaient constituées de plus de 30 unités disaccharidiques. Plus précisément, la plupart des glycanes appartenant aux 69.7 % possédaient 5 à 10 unités disaccharidiques. La longueur moyenne des chaînes de glycanes serait donc de 21 unités disaccharidiques. Remis en perspectives des dimensions du saccule d'*E. coli* (0,6 µm de largeur et 1,5 µm de longueur), cela signifie que les brins de glycanes les plus courts ne représentent que 1/300^e de la périphérie le long de l'axe court d'*E. coli* (Harz *et al.* 1990). Plus récemment, il a été révélé par AFM combinée à la chromatographie d'exclusion, que les chaînes de glycanes d'*E. coli* pouvaient mesurer jusqu'à 200 nm (Turner *et al.* 2018).

b. Modifications des saccharides de la chaîne de glycanes

Les saccharides de la chaîne de glycanes subissent une maturation chimique facultative au cours de la vie de la bactérie. Les impliquent majoritairement le C1, C2 et C6 des GlcNac et des MurNac et consistent en l'ajout ou la suppression d'un groupe fonctionnel, comme des groupements acétyl, mais également des polymères comme les acides téichoïques (Fig. 17). Chez les bactéries à Gram-positif notamment, des polymères de surface constituant la paroi, comme les acides téichoïques, sont greffés sur les chaînes de glycanes. Les modifications peuvent survenir durant les étapes de synthèse du précurseur de mucopeptide (lipide II) dans le cytoplasme, ou après polymérisation du précurseur à la chaîne de glycane dans le périplasme (Vollmer, Blanot, *et al.* 2008). La maturation des saccharides influence et module l'affinité et la reconnaissance des chaînes de glycanes par les enzymes de modification, comme les muramidases (Vollmer, Joris, *et al.* 2008) ou encore la sensibilité du PG aux enzymes lytiques comme le lysozyme (Amano *et al.* 1977) et les autolysines (Bonnet *et al.* 2017). Cette maturation post-synthèse du PG impacte donc la virulence de la bactérie car elle lui permet de résister plus efficacement au système immunitaire de l'hôte.

1,6-anhydroMurNac (anhMurNac)

Les chaînes de glycanes des bactéries à Gram-négatif se terminent généralement par un résidu non-réducteur particulier, appelé 1,6-anhMurNac (Fig. 17). C'est un dérivé de MurNac dans lequel le C1 et le C6 sont reliés par une liaison éther (Harz *et al.* 1990; Quintela *et al.* 1995; Vollmer *et Bertsche* 2008). Du côté des bactéries à Gram-positif, *S. aureus* ne possède pas cette modification, tandis que *B. subtilis* en possède une faible quantité (0.4 % du PG total) (Atrih *et al.* 1996).

N-désacétylation

Cette modification consiste en la désacétylation de l'amine en C2 des résidus GlcNac et MurNac du PG (Fig. 17). L'identification de sucres GlcNac non-acétylés a eu lieu en 1971 chez *Bacillus cereus* (Araki *et al.* 1971), puis plus tard, en 1984 pour le MurNac chez *Bacillus anthracis* (Zipperle *et al.* 1984). Le pourcentage de modification du PG varie fortement entre les espèces. Chez *B. anthracis*, 88 % des GlcNac et 34 % des MurNac sont N-désacétylés, tandis que 40 à 80 % des GlcNac et 10 % des MurNac sont N-désacétylés chez *S. pneumoniae* (Ohno *et al.* 1982; Zipperle *et al.* 1984). Cette modification est opérée par des N-désacétylases comme PgdA chez *S. pneumoniae* ou encore PdaA chez *B. subtilis*. Ces

enzymes ont fait l'objet d'études structure-fonction approfondies du fait de leur importance dans l'apparition de formes de bactéries résistantes aux muramidases (Blair *et al.* 2005; Fukushima *et al.* 2005; Taylor *et al.* 2006). En effet, la N-désacétylation des chaînes de glycanes rend le PG insensible à l'hydrolyse par le lysozyme car les groupements acétyles sont indispensables à la reconnaissance du PG par l'enzyme (Blake *et al.* 1965; Vocadlo *et al.* 2001). De fait, les modifications de la chaîne de glycane affectent la virulence d'un pathogène en empêchant l'action du système immunitaire. Chez le *S. pneumoniae*, PgdA chargée de la N-désacétylation du PG *in vivo*, contribue à la virulence de la bactérie en la protégeant contre l'action du lysozyme sécrété par l'hôte (Vollmer *et al.* 2000). Ces observations sont corroborées par l'étude effectuée chez *Listeria monocytogenes*, dont le mutant *pgdA* présente une sensibilité accrue au lysozyme (Boneca *et al.* 2007). Amano et ses collaborateurs ont montré que la N-acétylation du PG *in vitro* par l'anhydride acétique restaurait la capacité de dégradation du PG par le lysozyme.

Outre la protection du PG contre les enzymes lytiques du système immunitaire de l'hôte, la modification du PG peut le protéger contre les hydrolases bactériennes, appelées autolysines (Amano *et al.* 1977; Vollmer 2008; Vollmer, Joris, *et al.* 2008). Ces enzymes sont chargées de cliver les diverses liaisons existantes au sein du PG, dans les chaînes de glycanes comme dans les peptides-tiges. Il existe plusieurs classes d'autolysines de spécificités enzymatiques variées ciblant l'entière diversité des liaisons au sein du PG (Mueller *et al.* 2020). Les autolysines spécifiques des chaînes de glycanes sont appelées muramidases ou glucosaminidases. Le degré d'acétylation du PG influe sur leur affinité au substrat. De plus, la O-acétylation du MurNac médiée par Adr (attenuator of drug resistance) (Crisóstomo *et al.* 2006) protège le PG septal lors de la division cellulaire contre l'action de l'autolysine LytA (Bonnet *et al.* 2017). Récemment, il a été montré que la N-désacétylation du GlcNac permettait la localisation correcte du Système de sécrétion de type IV Dot/Icm chez *L. pneumophila* (Boamah *et al.* 2023), ce qui suggère que ces modifications pourraient jouer un rôle encore sous-estimé dans la diversité des processus physiologiques de la bactérie.

O-acétylation

L'O-acétylation consiste en l'acétylation de l'alcool primaire en C6 des GlcNac et MurNac (Fig. 17). Cette modification est largement répandue chez les bactéries à Gram-positif, et également présente chez quelques bactéries à Gram-négatif comme *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *H. pylori*, *Proteus mirabilis*. La O-acétylation diffère significativement de la N-acétylation dans la mesure où la liaison ester du groupement acétate lié en O est plus faible que la liaison amide de l'acétate lié en N (Vollmer 2008). De fait, les groupements acétyles liés en C6-OH sont très souvent perdus en conditions acides. C'est notamment le cas lors du traitement des fragments de PG pour analyse en HPLC (Vollmer 2008). Pour cette raison, les modifications O-acétylées ne sont pas observables dans les conditions classiques d'analyse de mucopeptides, mais doivent suivre un protocole spécial pour préserver ces groupements facilement éliminables (Bera *et al.* 2006). La O-acétylation a été mise en évidence sur les résidus MurNac et GlcNac chez *Lactobacillus plantarum* (Bernard *et al.* 2011). La proportion de résidus O-acétylés varie en fonction des espèces bactériennes et les conditions de culture. Ils représentent 24.7 % des résidus de PG chez *Bacillus cereus*, contre 69.4 % chez *Bacillus*

megaterium (Weadge et Clarke 2007). Chez *E. faecium*, la proportion de résidus O-acétylés est de 46.3 % en milieu de phase exponentielle, contre 57.1 % en phase stationnaire (Pfeffer et al. 2006). Cette modification est effectuée par des acétyltransférases membranaires telles qu'OatA (O-acétyl transférase) et ADR. L'inactivation des gènes *oatA* et *adr* résulte en la perte de la O-acétylation du PG chez *S. aureus* et *S. pneumoniae* respectivement (Bera et al. 2006; Crisóstomo et al. 2006). Elle se déroulerait dans le périplasma après la polymérisation du lipide II au PG et avant la transpeptidation des peptides-tiges (Vollmer, Blanot, et al. 2008).

Tout comme la N-désacétylation, l'O-acétylation confère aux bactéries une résistance à l'action lytique des autolysines et du lysozyme. Chez *S. aureus*, la O-acétylation du PG ainsi que les acides téichoïques et le haut degré de réticulation des peptides-tiges contribuent à la résistance contre l'activité hydrolytique du lysozyme et à la virulence de la bactérie (Bera et al. 2006). A la différence de la N-désacétylation, l'O-acétylation est fonctionnellement reliée à la réticulation du PG. En effet, le traitement de cellules à la pénicilline (inhibant les PBPs) réduit significativement le taux de O-acétylation chez *N. gonorrhoeae*, *S. aureus* et *P. mirabilis* (Dougherty 1985; Sidow et al. 1990). Par ailleurs, d'autres expériences ont montré que l'inhibition de PBP2 mène à des résultats similaires (Dougherty 1983). Le modèle proposé par Bonnet et ses collègues suggèrent que l'O-acétylation par OatA ou ADR de la chaîne de glycane préalablement à la transpeptidation est essentielle à la structuration du PG. A titre d'illustration, le mutant *adr* est plus sensible au clivage du peptide-tige par l'autolysine LytA (Bonnet et al. 2017). D'après leur modèle, l'action en concert de l'O-acétylation et de la transpeptidation permettraient la formation d'un PG robuste capable de résister à l'action LytA. Ainsi, les cellules délétées du gène *adr* présentent des défauts de la structure de la paroi cellulaire. De plus, ces mutants comportent des anomalies dans le processus de septation, qui sont corrélées à une localisation aberrante de FtsZ (analogue de la tubuline qui forme l'anneau contractile au site de division) (Bonnet et al. 2017). Par ailleurs, une étude récente a mis en évidence la différence de composition du PG en fonction de son état de maturation ou de son âge. En effet, la région latérale vieillissante du PG est enrichie en N-désacétylation chez *M. smegmatis* et appauvrie en O-acétylation/N-glycolylation par rapport aux régions aux pôles néosynthétisées (Rimal et al. 2022). Ce qui suggère que les N-désacétylations et O-acétylations, modifications apportées après la synthèse du PG, pourraient être des marqueurs régulant la maturation de la paroi bactérienne.

δ-lactame muramique

La formation du δ-lactame muramique est une modification spécifique des glycanes des bactéries sporulantes (Vollmer 2008) (Fig. 17). La sporulation se produit pour quelques cellules au sein d'une population bactérienne sous l'effet de carences nutritives stoppant tout métabolisme (dormance) ; elle débute à un pôle de la cellule par une invagination de la membrane cytoplasmique formant un septum séparant une partie du chromosome du reste de la cellule. La pré-spore s'entoure ensuite de différentes couches concentriques, le cortex et les enveloppes (Popham et Bernhards 2015). Les bactéries sporulantes sont pour la plupart des bactéries à Gram-positif comme *B. anthracis*, à l'exception de la bactérie *Sporomusa ovata* qui est une Négativicute (Poehlein et al. 2013). Les espèces du genre *Bacillus* ou *Clostridium sporogenes* possèdent une modification du MurNac caractérisée par

la formation d'une liaison amide intramoléculaire entre le groupe carboxyle du groupe lactyle en position C3 et le groupe amine en position C2. Chez *B. subtilis*, ces résidus sont distribués régulièrement tous les deux résidus de MurNac. En conséquence, 50 % de MurNac sont modifiés dans toute la cellule (Atrih *et al.* 1996; Popham *et al.* 1996; Wickus *et al.* 1972) tandis que chez *Micrococcus lysodeikticus*, ces modifications correspondent à 3-4 % des MurNac totaux (Hoshino *et al.* 1972). La formation de ce type de modification nécessite premièrement, que le groupe lactyl du MurNac soit dépourvu de peptide-tige, deuxièmement, que le MurNac soit désacétylé (Fukushima *et al.* 2002). Chez *B. subtilis*, les enzymes CwID et PdaA réalisent respectivement le clivage du peptide-tige et la désacétylation du MurNac (Sekiguchi *et al.* 1995). Le mutant de ces deux enzymes peut produire des spores intactes, mais incapables de germer en cellules viables (Popham *et al.* 1996). Les modifications δ -lactames ne sont pas nécessaires pour la sporulation, mais servent de marqueurs voués à la reconnaissance du PG par des hydrolases spécifiques dégradant le cortex avant la germination de la spore.

N-glycolylation

La N-glycolylation en C2 du MurNac a été décrite pour la première fois chez *M. smegmatis* (Adam *et al.* 1969) (Fig. 17). La présence d'acide N-glycolylmuramique est une caractéristique propre aux bactéries possédant des acides mycoliques comme les Mycobactéries, à l'exception du genre *Corynebacterium* qui possède des MurNac classiques (Azuma *et al.* 1970; Sutcliffe 1998). L'acide N-glycolylmuramique est, de fait, utilisé comme marqueur taxonomique pour l'identification et la classification des bactéries du genre apparenté aux Actinomycetales (Uchida *et al.* 1979). Contrairement aux modifications décrites précédemment, la N-glycolylation s'effectue dans le cytoplasme. Elle est introduite au niveau du lipide I, le précurseur cytoplasmique UDP-MurNac-pentapeptide, et non sur une chaîne de glycane périplasmique polymérisée.

Attachement de polymères anioniques de surface

Les polymères anioniques sont des macromolécules chargées négativement constituant la paroi bactérienne, tels que les acides téichoïques, les polysaccharides capsulaires et les arabinogalactanes. Ils sont attachés de manière covalente aux chaînes de glycanes par le C6 des résidus GlcNac ou MurNac (Fig. 17). Dans le cas du MurNac, un groupement phosphate est attaché en C6 (MurNac-6-phosphate), puis surmonté d'une unité-linker - de structure et composition inconnue - destinée à porter la protéine de surface. Ce résidu particulier de PG a été identifié pour la première fois en 1967 chez les bactéries à Gram-positif *Diplococcus pneumoniae*, *Streptococcus*, *S. aureus*, *Mycobacterium butyricum*, *Micrococcus lysodeikticus*, mais pas chez les bactéries à Gram-négatif *E. coli* et *Moraxella catarrhalis* (anciennement *Neisseria catarrhalis*) (Liu *et al.* 1967). Plus tard, un GlcNac portant des polymères anioniques a été identifié par Deng et ses collaborateurs chez les Streptocoques de groupe B (comme *Streptococcus agalactiae*) (Deng *et al.* 2000). La structure du GlcNac modifié varie substantiellement : il s'agit d'un GlcNac dont le C6 est directement relié à l'unité-linker, surmonté d'un groupement diphosphate rattaché au polymère de surface (Vollmer 2008).

6) Diversité des peptides-tiges

Les peptides-tiges sont des peptides de cinq acides-aminés rattachés au groupement D-lactate en C3 du MurNac par une liaison amide (Vollmer *et Bertsche* 2008). Ils permettent la cohésion des chaînes de glycanes entre elles, puisque deux peptides-tiges adjacents peuvent se coupler de manière covalente (mécanisme enzymatique décrit plus loin). L'analyse par HPLC du PG des bactéries à Gram-négatif *Aeromonas sp.*, *Acinetobacter acetoaceticus*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus morgani*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica* et *Escherichia coli* a montré que la composition du peptide-tige était similaire chez toutes ces bactéries L-Ala¹, D-iGlu², mDAP³, D-Ala⁴, D-Ala⁵ (Quintela *et al.* 1995). Plus récemment, la composition du PG de *P. aeruginosa* a été confirmée par rpHPLC-MS (Hugonneau-Beaufet *et al.* 2023). Cela laisse penser que le peptide-tige est bien conservé chez les bactéries à Gram-négatif.

En revanche, l'analyse du peptide-tige chez des bactéries à Gram-positif montre des variations sensibles de sa composition. Le peptide tige est composé de L-Ala¹, D-iGlu², L-Lys³, D-Ala⁴, D-Ala⁵ chez *S. aureus*, mais chez certaines autres bactéries à Gram-positif, D-iGlu² est amidé en D-iGln². La plupart de ces acides aminés du peptide-tige sont reliés entre eux par une liaison peptidique entre la fonction carboxyle de résidu n et la fonction amine portée par le carbone alpha de résidu n+1. La seule exception est le 2^{ème} résidu D-iGlu pour lequel c'est la fonction carboxyle du carbone δ -et non α - de la chaîne latérale qui est impliquée dans la liaison.

L'utilisation de techniques d'analyse du PG automatisées et plus sensibles a permis de mettre en évidence la grande diversité de la composition du peptide-tige, tant au niveau interspécifique qu'au niveau intraspécifique. Bien que les techniques basées sur l'analyse manuelle du PG restent robustes pour déterminer la composition majoritaire du peptide-tige, ces approches montrent bien que le peptide-tige n'a pas une composition unique. La variation de la composition du peptide-tige peut être liée d'une part à la spécificité des ligases Mur responsable de leur synthèse (Barreteau *et al.* 2008), et d'autre part, à sa modification tout au long du cycle cellulaire par l'action de carboxypeptidases ou d'endopeptidases qui éliminent les résidus du peptide-tige en position 4 ou 5. Les acides-aminés en position 4 ou 5 peuvent être échangés par des résidus glycine, D-tryptophane, D-méthionine ou encore D-aspartate par une réaction réalisée par des L,D-transpeptidases (Caparrós *et al.* 1992; Dramsi *et al.* 2008; Glauner 1988). Il a également été montré que les L,D-transpeptidases étaient capables d'incorporer des acides aminés non canoniques dans le PG. Cette propriété a été utilisée pour visualiser l'action de ces enzymes grâce à des acides-aminés fluorescents dans le PG (Pidgeon *et al.* 2019).

a. Diversité interspécifique

En première position du peptide-tige, la L-alanine (L-Ala) est retrouvée chez la plupart des espèces bactériennes, y compris les bactéries archétypales *E. coli* ou *B. subtilis*. Il peut cependant être substitué par d'autres résidus : une glycine chez *Mycobacterium leprae* et *Brevibacterium imperiale* ou par une L-serine chez *Butyrivacterium rettgeri* (Vollmer, Blanot, *et al.* 2008). En deuxième position, le D-isoglutamate (D-iGlu) présente chez bactéries à Gram-négatif, est substitué par la D-isoglutamine (D-

iGln) chez les bactéries à Gram-positif et les Mycobactéries. Par ailleurs, le threo-3-hydroxyglutamate peut être retrouvé chez *Microbacterium lacticum* ; il résulte d'une réaction de modification postérieure à la synthèse du peptide-tige. C'est en troisième position du peptide-tige que l'on retrouve la plus grande diversité de résidus identifiés. Par exemple, le mDAP n'est pas exclusivement retrouvé chez les bactéries à Gram-négatif, mais également chez les Bacilli (Gram-positif) et les Mycobactéries. La L-lysine (L-Lys) est néanmoins largement représentée chez la plupart des bactéries à Gram-positif. La L-ornithine (L-Orn) est retrouvée chez les Spirochètes, tandis que le L-2,4-diaminobutyrate et la L-homoserine sont présentes chez les Corynébactéries. Le L-glutamate (L-Glu) ou la L-alanine (L-Ala) sont respectivement retrouvés en troisième position de peptides-tiges chez *Arthrobacter* et *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Enfin, la D-alanine (D-Ala) occupe la quatrième position des peptides-tiges de toutes les bactéries. En cinquième position, on retrouve également l'ubiquitaire D-Ala. Mais on peut également retrouver la D-serine (D-Ser) chez *Enterococcus gallinarum* ou le D-lactate (D-Lac) chez *Lactobacillus casei* ou les Entérocoques. La modification du peptide-tige en D-Lac confère à la bactérie la résistance aux antibiotiques de type glycopeptides comme la vancomycine. En effet, cette dernière se fixe à l'extrémité terminale D-Ala⁴-D-Ala⁵ du peptide-tige. La modification en cinquième position D-Ala en D-Lac permet de diminuer l'affinité de la vancomycine pour le peptide-tige, ce qui en conséquence augmente la survie des bactéries en présence de cet antibiotique (Schneider et Sahl 2010).

b. Diversité intraspécifique

Au sein d'une même cellule bactérienne, les peptides-tiges peuvent posséder une composition différente. En effet, la vision d'un peptide-tige de composition unique a été balayée par l'utilisation de nouvelles techniques d'analyse du PG, plus sensibles et automatisées qui ont révélé une grande diversité de la composition des peptides-tiges chez les bactéries (Bern *et al.* 2017). De telles analyses ont été menées chez des bactéries à Gram-positif comme *Clostridium difficile*, *Enterococcus faecium* ou la bactérie à Gram-négatif *Pseudomonas aeruginosa* (Anderson *et al.* 2020; Bern *et al.* 2017; Chang *et al.* 2018). Par exemple, une étude récente portant sur l'analyse du PG de *P. aeruginosa* a montré que même si la composition-cœur de PG reste stable, les peptides-tiges subissent des multiples modifications selon la phase de croissance ou encore lors de la formation de biofilm (Anderson *et al.* 2020). Ces substitutions sont bien fluctuantes et peuvent être caractérisées par l'introduction d'arginine, de cystéine, de leucine, de lysine, de méthionine, de phénylalanine, de thréonine, de tryptophane, de tyrosine ou de valine en position 4 ou 5 du peptide-tige (Anderson 2020). Chez *Clostridium difficile*, les auteurs ont identifié des térapeptides composés en position 4 d'arginine, de lysine, d'histidine, de sérine, de glycine, d'alanine de méthionine, de valine, de tyrosine et de phénylalanine (Chang *et al.* 2018). Par ailleurs, l'abondance de ces différentes substitutions est variable, elles restent bien minoritaires par rapport à la composition « classique » du peptide-tige (Anderson *et al.* 2020). La substitution la plus abondamment retrouvée est l'incorporation de la glycine en position 5 ; la substitution de la glycine en position 4 est, quant à elle, moins abondante. De plus, l'étude comparative de la composition du PG selon l'état physiologique de la bactérie a montré que le taux de substitutions d'acides aminés dans le peptide-tige diminuait de 1,5 fois dans les conditions de « biofilm », comparé à la culture « planctonique » chez *P. aeruginosa* (Anderson *et al.* 2020). Ainsi, le

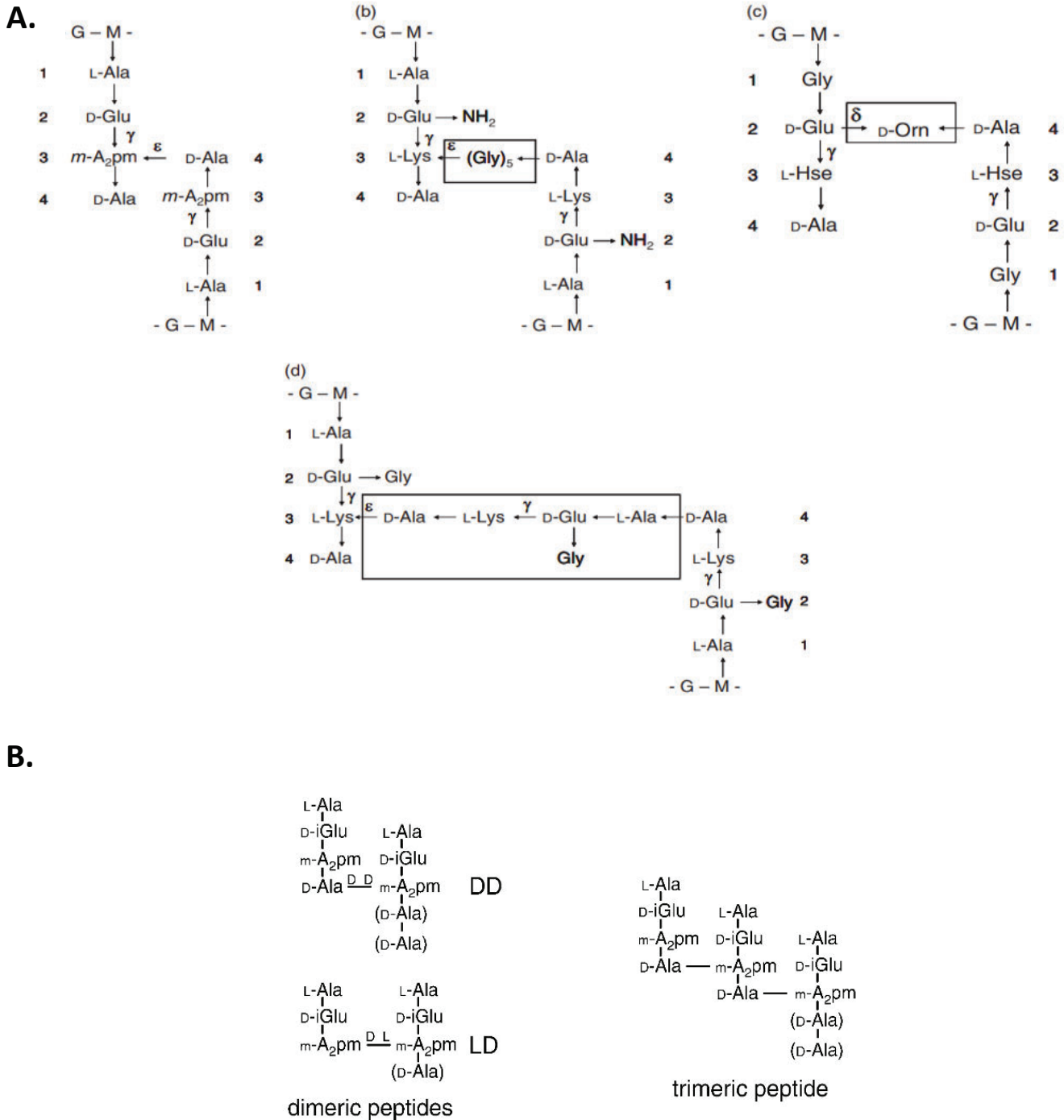


Figure 18. Diversité des couplages entre les peptides-tiges du PG. **A. a.** Couplage majoritaire 4→3 entre deux peptides-tiges chez les bactéries comme *E. coli* ou *B. subtilis*. Ce type de couplage est effectué par les PBP. **b.** Deux peptides-tiges reliés en 4→3 par un pont pentaglycine chez *S. aureus*. Ce type de couplage est caractéristique des bactéries à Gram +. **c.** Couplage 2→Orn←4 chez *Corynebacterium pointsettiae*. Les deux peptides-tiges sont reliés par une ornithine jouant le rôle d'accepteur d'électron pour les deux peptides-tiges. **d.** Pont interpeptidique constitué d'un peptide-tige lors d'une liaison 4→3 chez *Micrococcus luteus*. **B. A gauche**, les peptides-tiges peuvent s'assembler deux à deux (dimères) lors de liaisons 4→3 (DD) ou 3→3 (LD), ou, à **droite**, en trimères. D'après Vollmer *et al.* 2008.

PG subit une réelle adaptation de sa composition en fonction des conditions de culture. En effet, sur les 160 muropeptides identifiés chez *P. aeruginosa*, 80 ont vu leur abondance relative diminuer tandis que 50 ont vu leur abondance augmenter dans le PG issu du biofilm. Ces modifications incluent des substitutions d'acides aminés, ce qui peut témoigner des changements d'activité d'enzymes de modification du PG comme les amidases, désacétylases, et transglycosylases lytiques. Ceci indique bel et bien une modification de la composition du PG en fonction de l'état physiologique de la bactérie, que les auteurs assimilent à une adaptation face aux carences nutritionnelles rencontrées dans les conditions de biofilm. Les auteurs font ainsi une distinction entre deux types de PG : (i) le « PG-cœur » constitué des muropeptides présents en grande abondance, couramment identifiés avec les techniques moins sensibles (ce PG présente des fluctuations mineures en fonction des conditions de culture) et (ii) le « PG-adaptatif » qui comprend une panoplie de muropeptides dont les modifications sont moins bien caractérisées. Ce type de PG est présent en moindre abondance et varie significativement en fonction des conditions de culture. Par ailleurs, chez *E. faecium*, les conditions de biofilms étaient associées à une N-désacétylation accrue des GlcNAc, une diminution de la O-acétylation des MurNac et une augmentation des modifications des peptides-tige par les carboxypeptidases, ce qui signifie que le PG est moins renouvelé en condition biofilm qu'en condition planctonique (Chang *et al.* 2018).

c. Diversité des couplages entre les peptides-tiges

Chez les bactéries à Gram-négatif, le couplage s'effectue directement entre deux peptides-tige adjacents et différents résidus des peptides-tiges peuvent être couplés. Le couplage le plus abondant chez *E. coli* consiste au couplage du résidu 4 (D-Ala⁴) d'un peptide-tige donneur 4→3 et le résidu 3 (L-Lys³ ou mDAP³) d'un peptide-tige accepteur (Fig. 18). Plus précisément, le couplage s'effectue entre le groupement carboxyle du résidu D-Ala⁴ en position 4, et le groupement amine de la chaîne latérale d'un résidu L-Lys³ ou mDAP³ en position 3 (Vollmer, Blanot, *et al.* 2008). Ce couplage est réalisé par des enzymes appelées D,D-transpeptidases (voir §III.1). Il existe un autre couplage, réalisé par des L,D-transpeptidases, qui consiste au couplage entre les résidus en position 3 de deux peptides-tiges adjacents 3→3 (Magnet *et al.* 2008). Chez *E. coli*, l'abondance des couplages 3→3 augmente en phase stationnaire de croissance et en conditions de stress.

Chez les bactéries à Gram-positif, le couplage entre deux peptides-tiges peuvent être reliés par un pont interpeptidique de 1 à 7 résidus (Vollmer, Blanot, *et al.* 2008) (Fig. 18.A). Ce dernier peut être soit un autre peptide-tige (*Micrococcus luteus*), soit un pont pentaglycine, comme c'est le cas chez *S. aureus*, soit d'autres acides aminés : L-Ala, L ou D-Ser, D-Asx, L ou D-Glu. Chez *Corynebacterium pointsettiae*, un couplage particulier (2→Orn←4) relie le résidu D-Glu² en position 2 d'un peptide-tige donneur, à une D-ornithine, elle-même reliée au D-Ala⁴ en position 4 d'un peptide-tige donneur (Schleifer *et Kandler* 1972) (Fig. 18.A). Dans ce cas particulier, l'ornithine α - et γ -diaminée est accepteur d'acyl. Les couplages possibles entre les peptides-tiges ne sont pas exhaustivement représentés dans la nature, il est en effet possible d'introduire des couplages synthétiques/artificiels non présents dans la nature dans le PG des bactéries. Ainsi, *B. subtilis* est capable de croître en présence de 20 % de couplages (5→3) synthétiques (non réalisés par des enzymes) entre un acide-aminé non canonique

électrophile en position 5 et un résidu mDAP³ en position 3 (Dik *et al.* 2021). Ce mode de couplage interférait cependant avec la synthèse du PG septal, mais pas avec la synthèse du PG latéral (Dik *et al.* 2021). Cette observation suggère que les couplages présents dans la nature ont été sélectionnés pour répondre à des contraintes bien précises du PG liées aux contraintes que génère l'expansion de l'enveloppe cellulaire.

7) Degré de réticulation et nature du couplage du PG

Le degré de réticulation du PG correspond au pourcentage de peptides-tiges impliqués dans une liaison covalente au sein du PG. Le degré de réticulation du PG varie en fonction de la phase de croissance de la bactérie, des conditions environnementales et de la souche bactérienne considérée. Chez *E. coli*, 90 à 98 % du PG est réticulé en 4→3 et 2 à 10 % du PG est réticulé en 3→3 (Glauner 1988). En phase stationnaire, le PG d'*E. coli* s'enrichit de 16 % en pontages 3→3 par rapport à la phase exponentielle de croissance (Höltje 1998). Chez *M. tuberculosis* le PG réticulé en 3→3 représente près de 80 % des réticulations du PG total en phase stationnaire (Lavollay *et al.* 2008). Chez *M. smegmatis*, ces couplages sont principalement représentés par une association des peptides-tiges en trimères, c'est-à-dire que trois peptides-tiges sont simultanément impliquées dans une liaison covalente et qu'un peptide-tige sur les trois jouent à la fois le rôle d'accepteur et le rôle de donneur d'électrons (Rimal *et al.* 2022) (Fig. 18.B). Une étude réalisée chez *M. tuberculosis* a montré que l'abondance des pontages 3→3 était systématiquement supérieure à celle des pontages 4→3, quelques soient les phases de croissance de la bactérie (Kumar *et al.* 2012). De plus, le ratio 3→3 / 4→3 ne varie pas chez *M. tuberculosis*, contrairement à celui retrouvé chez *E. coli*. Le degré de réticulation du PG n'est pas anodin pour la bactérie car il impacte la virulence et la survie bactérienne. En effet, de la même façon que la N-désacétylation et la O-acétylation protègent le PG contre l'action du lysozyme, la présence de couplage 3→3 impacterait significativement l'accessibilité de la liaison β 1-4 des chaînes glycanes par les muramidases (Stankeviciute *et al.* 2019).

Par ailleurs, les acteurs de synthèse du PG agiraient en concert pour synthétiser un PG adapté à la survie de la bactérie. Ainsi, Atze *et al.* ont montré par HPLC couplée au marquage isotopique, qu'en présence de β-lactames, LdtD (YcbB) agissait en concert avec des 3→3 endopeptidases non inhibées par les β-lactames. Ces acteurs sont responsables de l'incorporation de chaînes de glycanes exclusivement attachées à des tripeptides-tiges (Atze *et al.* 2022). De plus, les auteurs montrent que le remodelage du PG n'est pas homogène le long de la cellule. En effet, les chaînes de glycanes sont insérées une à une dans le PG latéral, tandis que plusieurs chaînes sont insérées simultanément au niveau du septum. Chez *E. faecium*, le pourcentage du couplage global du PG augmente en conditions de biofilm (Chang *et al.* 2018).

Coxiella burnetii possède un cycle de développement biphasique qui génère des formes de cellules structurellement distinctes : une variante à grandes cellules (LCV) et de variante à petites cellules (SCV) (Sandoz *et al.* 2016). Les LCV sont des formes répliquatives en phase exponentielle, tandis que les SCV sont des formes non répliquatives en phase stationnaire. Outre de nombreuses propriétés propres à chacune des formes (le SCV possède un nucléoïde condensé et une enveloppe cellulaire inhabituelle,

soupçonnées de lui conférer une meilleure stabilité environnementale) l'analyse transcriptomique des gènes SCV régulés à la hausse comprenaient ceux impliqués dans les réponses au stress oxydatif, l'acquisition d'arginine et le remodelage de la paroi cellulaire. Une signature transcriptionnelle frappante du SCV était l'induction (>7 fois) de cinq gènes codant pour des L,D transpeptidases prédites qui catalysent des liaisons peptidiques 3→3 dans le PG (Sandoz *et al.* 2016). En conséquence, parmi les liaisons identifiées, l'analyse des mucopeptides a montré que le PG du SCV comportait 46 % de liaisons 3→3, contre 16 % de liaisons 3→3 pour le LCV (Sandoz *et al.* 2016). En parallèle les SCV en phase stationnaire surexpriment 5,9 fois CBU_0419, une protéine prédite pour être une PG-désacétylase (conférant la résistance au lysozyme). Ainsi, les modifications de la paroi cellulaire telles que la désacétylation et l'augmentation du couplage 3→3 pourraient protéger la bactérie contre la dégradation par le lysozyme, et donc favoriser la survie de *C. burnetii* au cours de l'infection de l'hôte.

8) Recyclage et édition du PG au cours du cycle cellulaire

La paroi cellulaire est une structure dynamique constamment assemblée, recyclée et remodelée par l'action d'enzymes comme les endopeptidases, les amidases, les carboxypeptidases, les muramidases et les transglycosylases lytiques. Les processus de remodelage de la paroi cellulaire, étroitement régulés, garantissent la survie de la bactérie. Ils sont directement liés, dans certains cas, à la résistance aux antibiotiques. Le remodelage produit des fragments de paroi cellulaire qui sont recyclés, mais qui peuvent également servir de messagers pour la communication bactérienne, de molécules effectrices dans la réponse immunitaire et de molécules de signalisation déclenchant la résistance aux antibiotiques (Domínguez-Gil *et al.* 2016).

Le recyclage du PG consiste en un démantèlement-réassemblage de sa structure en vue de sa réincorporation dans le PG. Le recyclage est indispensable au couplage efficace du PG de la bactérie, puisque les tripeptides formés après la prise en charge d'un pentapeptide par les PBP et les Ldts ne peuvent plus jouer le rôle de donneur d'acyl dans la réaction de transpeptidation. De fait, l'accumulation de tripeptides dans une cellule empêcherait le couplage de nouveaux éléments de PG. Ainsi, on estime que chez *E. coli*, environ 40 à 50 % du PG est recyclé à chaque génération et que la totalité des disaccharides-tripeptides sont recyclés (Goodell *et Schwarz* 1985). Ceux-ci sont pris en charge à la membrane cytoplasmique par une translocase appelée AmpG qui les conduit dans le cytoplasme. La protéine AmpD sépare la partie sucrée GlcNac-MurNac du tripeptide, qui peut ensuite réintégrer le cycle de synthèse du PG par la fixation directe à un UDP-MurNac dans le processus de synthèse du lipide II. Dans le cas du processus de recyclage, différentes hydrolases de la paroi cellulaire sont situées dans le périplasme et le cytoplasme de la bactérie. Les transglycosylases lytiques (LT) catalysent le clivage non hydrolytique de la chaîne de glycanes du PG, avec formation du N-acétyl 1,6-anhydromuramique non réducteur comme terminaison. Ce clivage peut être effectué à l'extrémité des brins de glycane (LT exolytique) ou au milieu de la chaîne de PG pour produire des fragments (LT endolytique). Le principal produit de la réaction est le N-acétyl-D-glucosamine-(β1-4)-1,6-anhydro-N-acétyl-D-muramyl-peptide (GlcNac-anhMurNac-peptide) qui est internalisé dans le cytoplasme par la perméase AmpG. Les molécules internalisées sont ensuite hydrolysées par NagZ, une glucosaminidase cytosolique capable d'hydrolyser la liaison glycosidique entre le GlcNac et le anhMurNac, puis par la

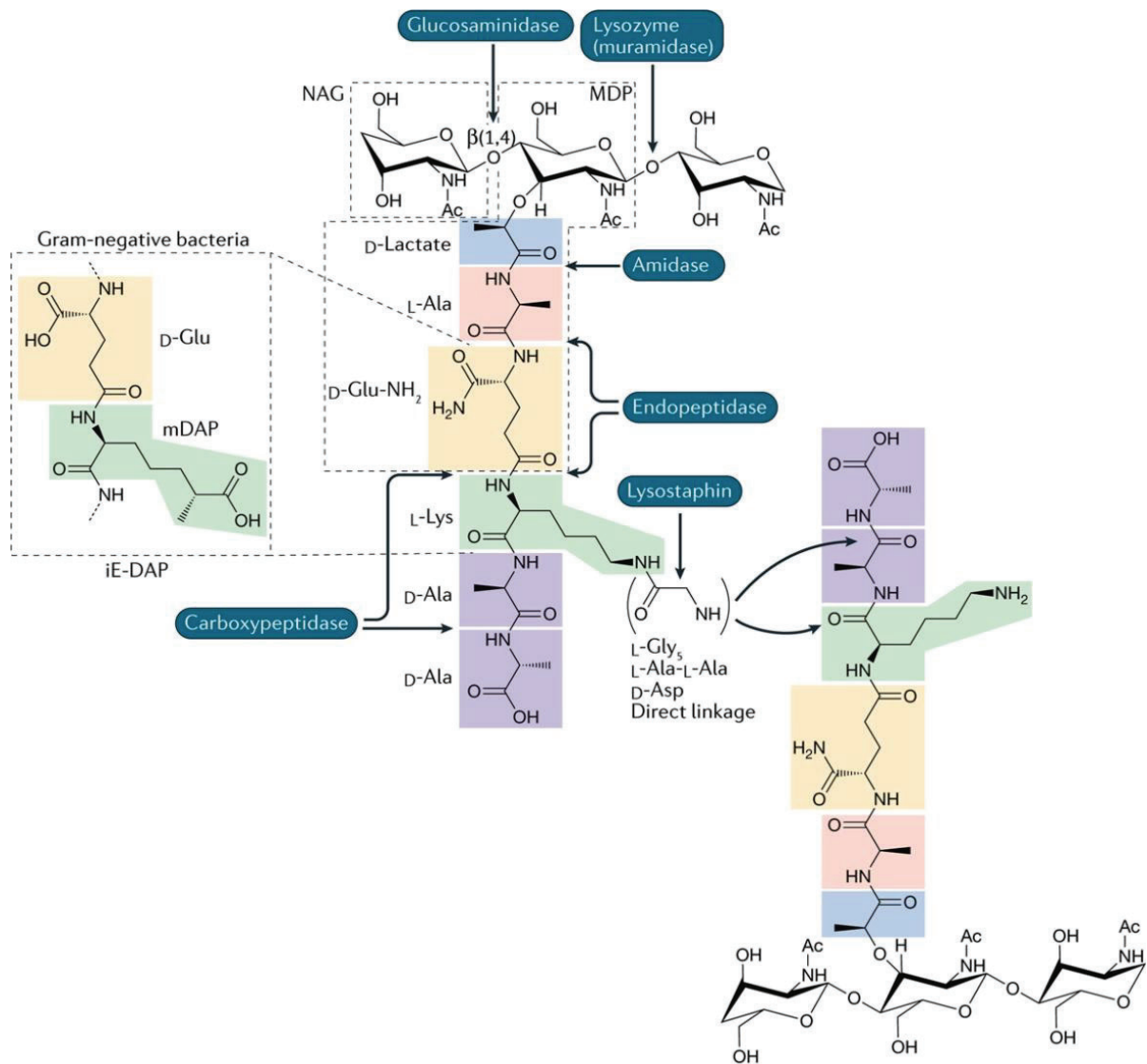


Figure 19. Action des enzymes lytiques sur les liaisons du PG. Muropeptide formé de N-acétylglucosamine (GlcNAc), d'acide N-acétylmuramique (MurNAc) et du pentapeptide-tige. Ce dernier, généralement formé de L-Ala¹, D-iGlu², mDAP³, D-Ala⁴, D-Ala⁵ chez les bactéries à Gram -, tandis que le résidu de L-Lys³ prend la place de mDAP³ chez les bactéries à Gram-positif. De plus, les peptides-tiges des bactéries à Gram-positif peuvent être couplés indirectement via des ponts inter-peptidiques (pentaglycines, L-Ala-L-Ala, D-Asp) ou directement, comme chez les bactéries à Gram -. Les glucosaminidases clivent la liaison osidique $\beta(1,4)$ entre le GlcNAc et le MurNAc, tandis que les muramidases (dont le lysozyme) clivent la liaison entre le MurNAc et le GlcNAc. Les amidases détachent le peptide-tige de la chaîne de glycanes en hydrolysant la liaison entre le D-lactate et le L-Ala¹. Les carboxypeptidases clivent les acides aminés C-terminaux. Les D,D-carboxypeptidases clivent la liaison entre le D-Ala⁴ et le D-Ala⁵, tandis que les L,D-carboxypeptidases hydrolysent la liaison entre le mDAP³ et le D-Ala⁴. Les endopeptidases, quant à elles, sont capables d'hydrolyser des liaisons peptidiques entre n'importe quels acides aminés du peptide-tige ; par exemple, la liaison entre le mDAP³ et Lpp. D'après Wolf *et al.* 2018.

PG amidase AmpD qui libère le peptide du anhMurNac. Dans des conditions normales, ces produits sont réincorporés dans la voie de biosynthèse. Cependant, en présence d'antibiotiques de la famille des β -lactamines, le processus de transpeptidation est inhibé. La polymérisation des chaînes de glycanes est désynchronisée de la réticulation, générant ainsi des brins de glycanes non réticulés qui sont rapidement dégradés par les transglycosylases lytiques (Cho, Uehara, et Bernhardt 2014). La paroi cellulaire ainsi fragmentée induit un dysfonctionnement de la machinerie de synthèse impliquant un cycle futile de synthèse et de dégradation de la paroi cellulaire, épuisant ainsi les ressources cellulaires (Cho et al. 2014). Chez certaines bactéries à Gram-négatif, le peptide anhMurNac internalisé est détecté par AmpR et entraîne l'expression de la β -lactamase AmpC, une enzyme clé de la résistance aux β -lactamines. Lorsque l'UDP-MurNac-pentapeptide est lié à l'AmpR, l'expression de l'AmpC est réprimée. En présence d'antibiotiques de la famille des β -lactamines, les anhMurNac s'accumulent et détachent l'UDP-MurNac-pentapeptide de l'AmpR. La β -lactamase AmpC est exprimée et exportée vers le périplasma pour neutraliser les β -lactames (Van Heijenoort 2011).

a. Les autolysines bactériennes, enzymes endogènes de remodelage du PG

Chez *E. coli*, les autolysines sont impliquées dans la croissance, la séparation cellulaire, la morphogénèse et la maturation du PG. Les liaisons entre les chaînes de glycanes doivent être rompues afin d'étendre et de permettre la division du saccule. Une grande diversité d'enzymes permet de cliver toutes les liaisons existantes dans le PG. Les enzymes hydrolysant le PG ont été classifiées en deux classes : les glycosidases, enzymes actives sur les chaînes de glycanes et les peptidases, actives au niveau du peptide-tige (Do et al. 2020). Les autolysines sont définies comme des enzymes lytiques bactériennes endogènes, les hydrolases et lyases, chargées de cliver les liaisons covalentes au sein du PG (Mueller et Levin 2020) (Fig. 19). La grande diversité de ces enzymes permet de cliver toutes les liaisons existantes dans le PG. On peut distinguer les enzymes actives sur les chaînes de glycanes, les glycosidases et celles qui sont actives au niveau du peptide-tige, les peptidases (Do et al. 2020). Tout d'abord, les glycosidases regroupent les glucosaminidases (GlcNac-MurNac), les muramidases (MurNac-GlcNac) et les transglycosylases lytiques clivent la liaison MurNac-GlcNac, avec la formation concomitante d'un résidu 1,6-anhydroMurNac (Scheurwater et al. 2008) (Fig. 19). Chez *E. coli*, ces enzymes sont impliquées la maturation du PG, la croissance et la division puisque les liaisons du PG doivent être cassées pendant la croissance cellulaire afin de permettre l'insertion de PG dans le saccule (Singh et al. 2012). Ensuite, les peptidases : la division cellulaire chez *E. coli* est principalement réalisée par l'activité combinée de trois amidases (AmiA, AmiB et AmiC), qui clivent la tige-peptidique de la chaîne de glycanes pour produire des glycanes « dénudés » (Priyadarshini et al. 2006). Les amidases comme AmiC détachent le peptide-tige de la chaîne de glycanes du PG (Fig. 19). Elles sont indispensables au remodelage local du PG au niveau du site de division afin de permettre la septation des deux cellules-filles (Rocaboy et al. 2013; Vermassen et al. 2019). D'autres enzymes sont spécialisées dans le clivage des liaisons contenues dans le peptide-tige. C'est le cas des endopeptidases, qui clivent les liaisons peptidiques au sein du peptide-tige (MepA, MepM, MepS, MepH, MepK, PBP4, PBP7) (Fig. 19). Les DD-endopeptidases sont spécialisées dans le clivage des liaisons entre deux peptides-tiges adjacents (Mueller et Levin 2020). Chez *E. coli*, trois DD-

endopeptidases, MepA, MepS et MepM, hydrolysent les liaisons entre les peptides-tiges afin de faire de la place pour l'insertion du PG néosynthétisé (Singh *et al.* 2012). Certaines endopeptidases et transglycosylases lytiques peuvent également contribuer à la séparation des cellules (Priyadarshini *et al.* 2006; Vermassen *et al.* 2019). Voedts et ses collègues ont montré que l'hydrolyse du PG par les endopeptidases était indispensable à son expansion en présence de β -lactames (Voedts *et al.* 2021). Plus précisément, le découplage de peptides-tiges 4 \rightarrow 3 par l'action d'endopeptidases MepA (hydrolyse les liaisons 4-3 et 3 \rightarrow 3 *in vivo*), MepM (qui hydrolyse les couplages 4-3 *in vivo*) et MepK (hydrolyse les liaisons 3 \rightarrow 3) sont indispensables à l'action de LdtD chez *E. coli* (Voedts *et al.* 2021). Par ailleurs, les auteurs ont montré que de façon inattendue, les huit endopeptidases Mep d'*E. coli*, dont MepK et MepM, présentaient une double spécificité enzymatique et seraient actives sur les liaisons 4 \rightarrow 3 et 3 \rightarrow 3, alors que les D,D-endopeptidases sont exclusivement responsables du clivage des liaisons 4 \rightarrow 3 (Voedts *et al.* 2021). MepK est spécifiquement nécessaire à la croissance si le PG contient une grande proportion de liaisons (3 \rightarrow 3, tandis que MepM est également nécessaire à la résistance aux β -lactamines, à moins qu'elle ne soit la seule endopeptidase restante, auquel cas elle est également nécessaire à la croissance en l'absence de l'antibiotique.

Les carboxypeptidases clivent quant à elles la liaison entre l'acide aminé en position 4 ou 5 du peptide-tige (Fig. 19). Les carboxypeptidases réduisent donc la longueur du pentapeptide à quatre ou trois acides aminés. Cela détermine en conséquence les types de liaisons qui seront formées par les couplages covalents 4 \rightarrow 3 ou 3 \rightarrow 3 lors de la réticulation du PG. Les transglycosylases lytiques, clivent la liaison glycosidique (β -1,4) entre les disaccharides. Ces enzymes influencent la longueur des chaînes de glycanes (Yunck *et al.* 2016) et contribuent au recyclage du PG, qui peut représenter jusqu'à 50 % du matériel PG total par génération chez *E. coli* (Kraft *et al.* 1999).

Le PG peut subir une modification ou une dégradation considérable en fonction de la phase de croissance ou de la présence de facteurs de stress environnementaux. Ces modifications remplissent des fonctions importantes dans divers processus, notamment le renouvellement du PG, l'élongation/division cellulaire et la résistance aux antibiotiques (Anderson *et al.* 2020). Par ailleurs, les bactéries doivent éviter d'être reconnues par le système immunitaire de l'hôte. Chez les animaux et les plantes, le PG est reconnu par des récepteurs spécifiques de l'hôte (PGRP, protéines de reconnaissance du PG) qui déclenchent une réponse immunitaire. Les autolysines des bactéries pathogènes à Gram positif *S. aureus* ou *S. pneumoniae*, jouent un rôle majeur dans la dissimulation de cette molécule inflammatoire aux protéines de reconnaissance du PG chez la drosophile *D. melanogaster* (Atilano *et al.* 2014). Les autolysines découpent les fragments de PG les plus externes et en leur absence, la virulence bactérienne est altérée, car les PGRP peuvent reconnaître directement le PG résiduel qui s'étend au-delà acides téichoïques, des protéines de surfaces ou des polysaccharides bactériens. De plus, l'activité des autolysines ne se limite pas aux cellules productrices, mais peut également modifier la surface des bactéries voisines, ce qui facilite la survie de l'ensemble de la population dans l'hôte infecté (Atilano *et al.* 2014).

Les transglycosylases lytiques sont très importantes pour le cycle de vie de la bactérie car elles permettent de libérer de la place au sein du saccule pour la biosynthèse, le recyclage, la division cellulaire et l'insertion de structures traversant l'enveloppe bactérienne comme les flagelles et les

systèmes de sécrétion (Scheurwater *et al.* 2008). Outre la mise en place des machineries de sécrétion à travers la membrane, l'édition du PG est utilisée pour des systèmes moins complexes de sécrétion de protéines dans le milieu extérieur. C'est le cas d'un système utilisé par les bactériophages, retrouvé dans un système analogue chez les bactéries comme *Klebsiella aerogenes*, *Citrobacter freundii* et *Serratia marcescens*, qui a été nommé système de sécrétion de type 10 (TXSS) dont le mécanisme n'est pas entièrement élucidé. Le TXSS est formé d'une holine membranaire qui fonctionne en tandem avec une endolysine, protéine d'édition de la paroi (muramidase ou endopeptidase), dont les gènes sont codés en cluster sur le génome. Les holines sont de petites protéines membranaires qui s'accumulent dans la membrane « jusqu'à ce qu'elle devienne soudainement perméable à l'endolysine » (Wang *et al.* 2000). Cela permet la sécrétion de substrats depuis le périplasme jusque dans le milieu extérieur. *S. marcescens*, dépourvue du T2SS, sécrète ainsi par une chitinase via le TXSS (Palmer *et al.* 2021). De plus, chez les bactéries à Gram-négatif, de nombreux systèmes multiprotéiques traversent l'enveloppe bactérienne, y compris la couche de PG. Ces systèmes incluent des structures impliquées dans la motilité et l'adhésion (flagelles et pili), dans l'export de composés toxiques (pompes à efflux) et la sécrétion de protéines, d'ADN et d'effecteurs variés (TSSI à XI) (Scheurwater *et Burrows* 2011). La taille des pores du PG n'est pas compatible avec l'insertion de ces larges complexes multiprotéiques sans remodelage local du PG. Les hydrolases et les amidases clivent et remodelent localement le PG afin de permettre l'incorporation et l'assemblage de ces machineries à travers la couche de PG. Les transglycosylases lytiques (LTG) sont impliqués dans l'assemblage de grandes structures trans-enveloppe telles que le système de sécrétion de type II (T2SS), T3SS et T4SS, ainsi que des organites de surface, notamment les pili de type 4 (T4P) et les flagelles (Herlihey *et al.* 2014; Scheurwater *et Burrows* 2011; Zahrl 2005). Ils sont nécessaires pour élargir les espaces localement dans le PG afin de permettre l'assemblage et l'ancrage efficaces des complexes de transport dans l'enveloppe cellulaire. Par exemple, VirB1 est impliqué dans l'assemblage du T4SS (Höppner *et al.* 2005), FlgJ dans le flagelle (Nambu *et al.* 1999), et EtgA dans le T3SS (García-Gómez *et al.* 2011). PilT est considérée comme impliquée dans l'assemblage du T2SS, y compris le T4P (Koraimann 2003). Chez *Salmonella typhimurium*, FlgJ (flagellar protein J) présente une GHF-73 dont l'activité glycosidase est essentielle pour l'assemblage des flagelles car elle dégrade localement le PG (Nambu *et al.* 1999). Par exemple, le T6SS, d'un diamètre estimé à 18 nm par microscopie électronique, est plus large que le diamètre des pores du PG (2 nm) (Santin *et Cascales* 2017). Santin et collaborateurs ont montré que la transglycosylase lytique de ménage, MltE, était spécifiquement recrutée pour l'assemblage du T6SS dans l'enveloppe. La dégradation locale du PG par MltE initie l'oligomérisation de TssM, une protéine du T6SS ancrée à la MI, et l'assemblage du complexe membranaire (Stietz *et al.* 2020). De plus, l'interaction entre le domaine périplasmique de TssM et MltE, stimule l'activité de MltE (Santin *et Cascales* 2017). Selon les auteurs, cette étroite interaction témoigne d'une « domestication » de la transglycosylase pour l'assemblage du T6SS. De même, chez *Acinetobacter baumannii*, la L,D-endopeptidase TagX associée à la membrane est indispensable pour mettre en place un T6SS fonctionnel (Ringel *et al.* 2017; Weber *et al.* 2016). Ainsi, ces enzymes seraient indispensables à l'assemblage de la machinerie T6SS, en assurant la digestion du PG, hautement régulée dans l'espace et dans le temps.

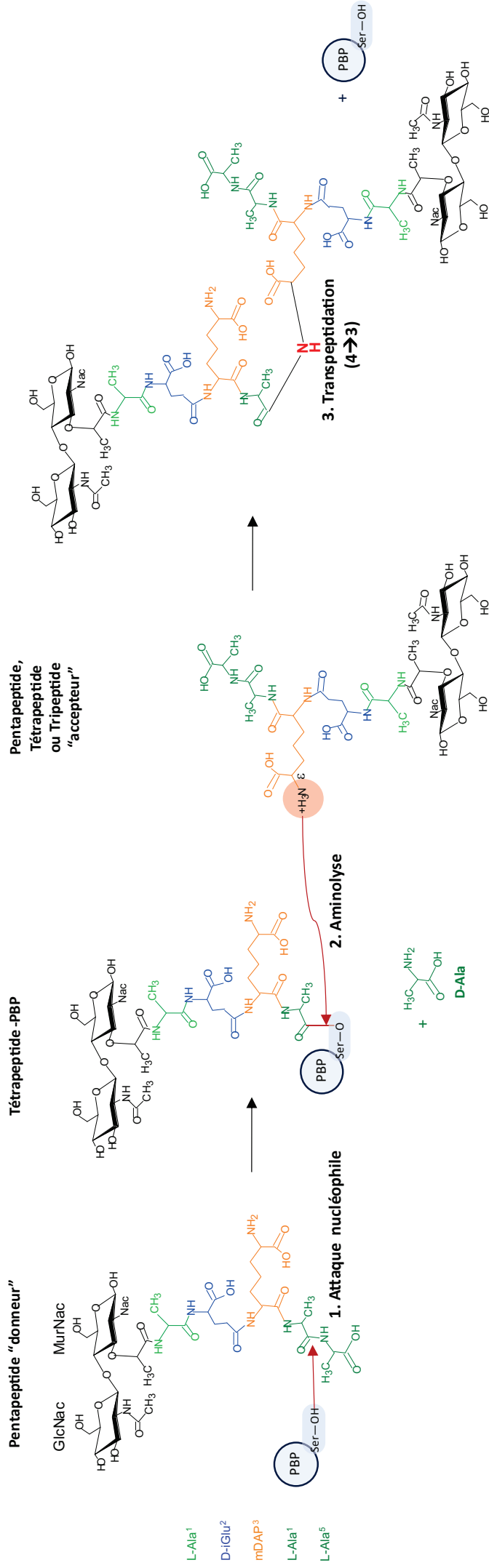


Figure 20. A. Mécanisme de transpeptidation réalisé par les PBPs. 1. La sérine catalytique de la PBP exerce une attaque nucléophile sur le groupe carbonyle impliqué dans la liaison peptidique entre le D-Ala⁴ et le D-Ala⁵ d'un pentapeptide-tige « donneur ». Lors de la réaction le D-Ala⁵, nucléofuge est éliminé (en vert) ce qui aboutit à la formation d'un complexe acyle-enzyme formé par la PBP et un tétrapeptide-tige (penta- ou tripeptide-enzyme subit une aminolyse par l'amine d'un résidu L-Lys³ (Gram-positif) ou mDAP³ (Gram-négatif) d'un peptide-tige (penta- ou tripeptide-tige « accepteur »). 3. Cela aboutit à la transpeptidation D-Ala⁴→mDAP³ (4→3) d'un tétrapeptide à un peptide-tige adjacent.

III) La transpeptidation est la dernière étape de la synthèse du PG

La transpeptidation est une réaction entraînant le transfert d'un acide-aminé à un autre ou à un peptide (Lupoli *et al.* 2011). A l'issue de la transpeptidation, une liaison covalente s'établit entre la fonction acide carboxylique de l'acide-aminé n et la fonction amine portée par l'acide-aminé $n+1$. Dans le cas du PG, la transpeptidation de deux peptides-tiges de chaînes de glycanes adjacentes permet d'établir une liaison covalente entre leurs acides-aminés (couplage covalent) et par conséquent, l'assemblage des chaînes de glycanes en une structure tridimensionnelle s'apparentant à un réseau (Vollmer, Blanot, *et al.* 2008) (Fig. 13). La transpeptidation des peptides-tiges est un mécanisme en deux temps effectué par des enzymes appelées transpeptidases. En premier lieu, la transpeptidase prend en charge un peptide-tige « donneur » d'électrons, ce qui forme un complexe acyl-enzyme, qui est hydrolysé par la fonction amine électrophile (NH_3^+) en position ϵ du 3^e résidu (L-Lys ou mDAP), d'un peptide « accepteur », ce qui aboutit au couplage covalent des deux peptides-tiges (Fig. 20.A et 20.B). Il faut toutefois noter que tous les peptides-tiges du PG en sont pas impliqués dans une liaison covalente : chez *M. smegmatis* 45 % des mucopeptides sont impliqués dans un couplage covalent en condition planctonique (Rimal *et al.* 2022), 43 % chez *P. aeruginosa* (Anderson *et al.* 2020) et 40 % chez *E. coli* (Sauvage *et al.* 2008). Le couplage covalent des peptides-tiges est effectué par des enzymes appelées transpeptidases. Il existe deux catégories de transpeptidases identifiées à ce jour. Premièrement, les transpeptidases majoritaires et les plus actives chez *E. coli* sont les D,D-transpeptidases, également appelées Penicillin Binding Protein (PBP) du fait de leur capacité à fixer la pénicilline (un antibiotique de la famille des β -lactamines) dans leur site actif. Elles réalisent des liaisons 4 \rightarrow 3 dans le PG (Fig. 20. A). Deuxièmement, une autre catégorie de transpeptidases, appelées L,D-transpeptidases, catalysent la formation de liaisons 3 \rightarrow 3 dans le PG.

Les β -lactamines sont des inhibiteurs compétitifs des transpeptidases empêchant la synthèse du PG

Le noyau lactame des β -lactamines mime la liaison entre le D-Ala⁴ et le D-Ala⁵ reconnu par les PBPs. Les β -lactames sont des inhibiteurs compétitifs qui se comportent comme des « substrats-suicides » vis-à-vis des PBPs. Ceux-ci se fixent de manière irréversible dans le site catalytique de l'enzyme, et par conséquent inactive la PBP. L'inactivation des enzymes par les β -lactamines consiste en la formation d'un complexe enzyme/ β -lactame par un mécanisme appelé acylation. L'acylation des PBPs se traduit par l'établissement d'une liaison ester entre la fonction alcool sérine catalytique de la PBP et le carbonyle du noyau lactame des β -lactamines. On pense que l'activité bactéricide des β -lactamines résulte du découplage des réactions de transglycosylation et de transpeptidation, conduisant ainsi à l'accumulation de chaînes de glycanes non réticulées dans le périplasme et à l'activation d'un cycle infini de polymérisation et d'hydrolyse des chaînes de glycanes. Cette répétition de réactions cataboliques et anaboliques, très coûteuses énergétiquement, engendrerait la mort de la cellule (Cho *et al.* 2014 ; Lobritz *et al.* 2022). Les bactéries produisent des β -lactamases qui coupent le noyau lactame, afin d'empêcher l'inhibition des PBPs par les β -lactamines.

L'acylation des Ldts se traduit par l'établissement d'une liaison thioester entre le groupement thiol de la cystéine catalytique de la Ldt, et le carbonyle du noyau lactame des β -lactamines (Fig. 12.A).

Contrairement aux D,D-transpeptidases (PBPs), les Ldts ne sont pas inhibées par les pénicillines, mais sont inhibées par les carbapénèmes, les céphalosporines et les céphèmes (Kumar *et al.* 2017:20; Pidgeon *et al.* 2019) (Fig. 12.A et 12.B). Néanmoins, l'acylation des Ldts par les pénicillines et les céphalosporines est une réaction lente (Triboulet *et al.* 2013). De plus, contrairement aux PBPs, l'acylation des Ldts est réversible puisqu'elle est suivie d'une réaction d'hydrolyse, ce qui empêche l'inactivation complète des Ldts par les β -lactamines (Triboulet *et al.* 2013) (Fig. 12.B). Par ailleurs, la Ldt_{Ab} d'*Acinetobacter baumannii* possède une structure particulière qui induit une très faible cinétique d'acylation, et donc une faible inhibition de l'enzyme par les carbapénèmes (plus de quatre heures *in vitro*) (Toth, Stewart, *et al.* 2022) (Fig. 12.B). Cela cause des préoccupations majeures puisque *A. baumannii* est un pathogène émergent en milieu hospitalier (Toth, Lee, *et al.* 2022). De manière assez inattendue, une étude a montré que les cellules d'*E. coli* ou *E. faecium* cultivées en présence de chlorure de cuivre ont comporté un PG dépourvu de liaisons 3 \rightarrow 3 et présenté une quantité moindre de Lpp couplée au PG (Peters *et al.* 2018). Aussi, le cuivre utilisé à une concentration submillimolaire a considérablement réduit la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'ampicilline chez les souches d'*E. coli* et d'*E. faecium*, suggérant l'inhibition des Ldts par le cuivre (Peters *et al.* 2018). Les auteurs ont suggéré que les ions Cu²⁺ peuvent inhiber les Ldts en se liant sur le groupement thiol de la cystéine du site actif.

1) [Les D,D-transpeptidases, ou PBPs](#)

a. [Les D,D-transpeptidases \(PBPs\) sont responsables de la réticulation 4 \$\rightarrow\$ 3 du PG](#)

Les D,D-transpeptidases (Interpro IPR012338) effectuent la réticulation 4 \rightarrow 3 de peptides-tiges (Fig. 20.A). Lors de la réaction de transpeptidation, les D,D-transpeptidases reconnaissent la liaison D-Ala⁴-D-Ala⁵ d'un pentapeptide-tige « donneur » (Apostolos *et al.* 2020) (Fig. 20.A). La sérine catalytique de la D,D-transpeptidase réalise une attaque nucléophile sur la liaison D-Ala⁴-D-Ala⁵, ce qui entraîne le départ simultané du 5^e résidu (D-Ala⁵) du pentapeptide-tige (activité carboxypeptidase), et la formation d'un complexe par liaison covalente entre l'enzyme et le tétrapeptide-tige, formant un complexe acyle-enzyme (Edoo *et al.* 2017) (Fig. 20.A). Le complexe acyle-enzyme subit par la suite une hydrolyse par l'amine primaire du résidu mDAP³ ou Lys³ (aminolyse) d'un peptide-tige adjacent, appelé peptide « accepteur » d'acyle. Ceci mène à la formation d'une liaison peptidique 4 \rightarrow 3 (D-Ala⁴-mDAP³) entre le D-Ala⁴ d'un tétrapeptide-tige « donneur » et le mDAP³ ou Lys³ d'un peptide-tige « accepteur » (activité transpeptidase) (Fig. 20.A). Étant donné que la fonction amine est portée par le 3^e résidu du peptide-tige, les penta-, tétra- ou tri-peptide-tige le possédant peuvent jouer le rôle d'« accepteur » d'acyle dans la réaction de transpeptidation (Magnet *et al.* 2008). En revanche, le substrat « donneur » des D,D-transpeptidases est obligatoirement un pentapeptide-tige. Chez *E. coli*, les PBPs est majoritairement responsable de la réticulation du PG. En effet, en phase exponentielle de croissance, 93 % de peptides-tiges impliqués dans une liaison covalente sont couplés en 4 \rightarrow 3 par l'activité D,D-transpeptidase des PBPs (Sauvage *et al.* 2008).

b. Les PBPs de classe A, de classe B et de classe C

Les PBPs sont classées en trois catégories fonctionnelles. Les PBPs de classe I, comprennent deux sous-classes de PBPs de poids moléculaire élevé (HMW): les PBPs de classe A, bifonctionnelles, réalisent à la fois des réactions de glycosyltransférase (domaine N-terminal, responsable de l'élongation des chaînes glycanes par insertion du lipide II) et de transpeptidation (domaine C-terminal) ; et les PBPs de classe B, monofonctionnelles, réalisent des réactions de transpeptidation (domaine C-terminal) (Sauvage *et al.* 2008). Les PBPs de catégorie II et III, comprennent les PBPs de faible poids moléculaire (LMW) : les PBPs de classe C qui possèdent une activité carboxypeptidase (Arora *et al.* 2018; Sauvage *et al.* 2008).

E. coli possède 5 PBPs de HMW, dont trois PBPs bifonctionnelles de classe A (PBP1a, PBP1b et PBP1c) et deux PBPs monofonctionnelles de classe B (PBP2 et PBP3/FtsI), tandis que *B. subtilis* possède quatre PBPs de classe A et six PBPs de classe B (Sauvage *et al.* 2008). Ces enzymes sont essentielles pour la croissance et la division chez *E. coli* et sont des cibles privilégiées pour les antibiotiques de la famille des β -lactames (Kocaoglu et Carlson 2015). *E. coli* possède également 7 PBPs de LMW appartenant à la classe C (PBP4, PBP4b, PBP5, PBP6, PBP6b, PBP7, AmpH et PBP8 générée par le clivage protéolytique de PBP7). Elles sont responsables de la maturation et du recyclage du PG, mais ne sont pas essentielles (Ogawara 2015; Pratt 2008).

Les PBPs de classe A

Les PBPs de classe A sont des enzymes bifonctionnelles (activité glycosyltransférase et transpeptidase). Chez *E. coli*, les PBP1a, PBP1b et PBP1c sont respectivement codées par les gènes *mrcA*, *mrcB* et *pbpC*. PBP1a et PBP1b sont les PBPs les mieux étudiées chez *E. coli* ; elles synthétisent plus de la moitié du PG de la cellule à chaque génération (Kang *et al.* 2021). PBP1a fait partie de l'élongasome, tandis que PBP1b fait partie du divisome (Vollmer *et Bertsche* 2008). Dans des conditions de croissance en laboratoire, PBP1a et PBP1b peuvent mutuellement se compenser, tandis que dans des conditions alcalines et acides, PBP1a et respectivement PBP1b sont indispensables à la viabilité de la bactérie (Mueller *et Levin* 2020). Ces résultats suggèrent que PBP1a et PBP1b ne sont pas redondantes, ce qui est confirmé par les études récentes chez *A. baumannii*, révélant que seule la délétion de *mrcA* (et non *mrcB*) contribue à la résistance à la colistine (Kang *et al.* 2021). En revanche, il a été montré que PBP1c était une protéine essentielle (Yousif *et al.* 1985).

Alors que l'on pensait que les PBPs de classe A étaient les seules glycosyltransférases de la cellule, il a été montré que les protéines de la famille SEDS (shape, elongation, division and sporulation) RodA et FtsW possédaient également une activité glycosyltransférases (Emami *et al.* 2017; Taguchi *et al.* 2019). RodA et FtsW sont des composants essentiels hautement conservés respectivement présents dans le l'élongasome et dans le divisome, machineries responsables de la synthèse du PG latéral et septal respectivement. Ainsi, *E. coli*, *B. subtilis*, et probablement la plupart des bactéries, utilisent deux classes distinctes de polymérase pour synthétiser le PG : l'activité glycosyltransférase et transpeptidases des PBPs de classe A, mais également l'activité glycosyltransférase des protéines de la famille SEDS (Meeske *et al.* 2016).

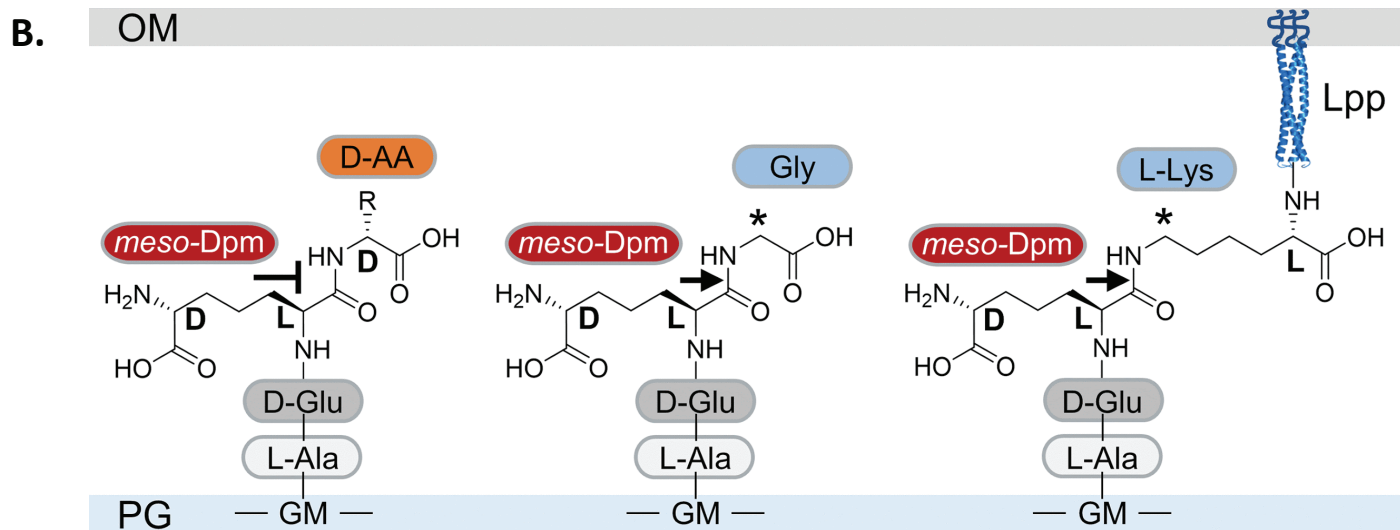
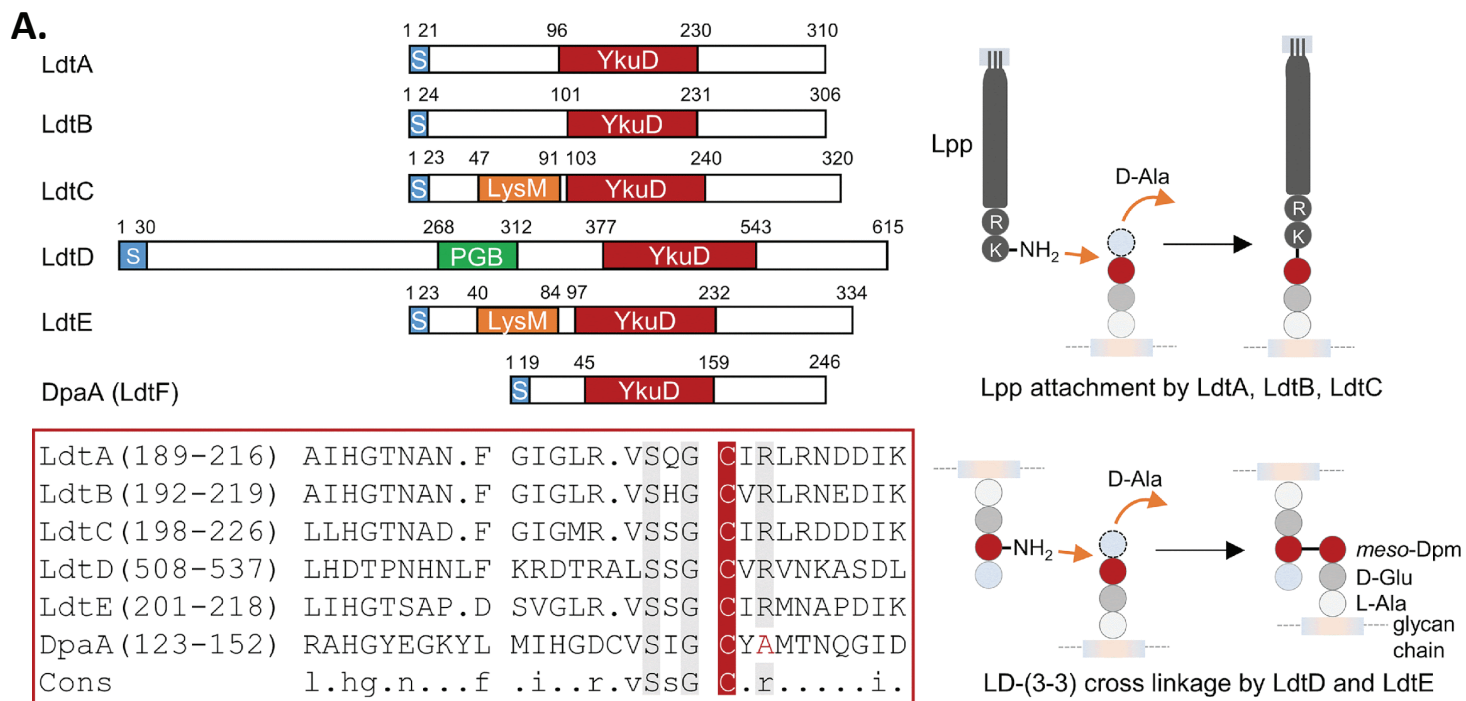


Figure 21. A. Séquences et domaines des 5 Ldts et de l'endopeptidase DpaA (LdtF) d'*E. coli*. Les Ldts et DpaA possèdent toutes un domaine YkuD (en haut à gauche, en rouge). Régions protéiques : S, peptide signal ; LysM et PGB, domaines de liaison au peptidoglycane. Les numéros indiquent les positions des acides aminés. L'alignement des séquences d'une partie du domaine YkuD (en bas à gauche) montre la cystéine du site actif (C, en rouge) et d'autres acides aminés conservés, en gris. DpaA (LdtF) possède une alanine à la place de l'arginine conservée et agit comme une amidase. Sur le côté droit, on peut voir que LdtA, LdtB et LdtC attachent Lpp au mDAP (meso-Dpm) du peptide-tige. LdtD et LdtE forment des liaisons 3→3 dans le PG. **B. Modes d'action de DpaA (LdtF).** DpaA hydrolyse la liaison amide entre le mDAP³ et le Gly⁴ ou mDAP³ et le groupe ε-amino de la lysine C-terminale de Lpp. Les deux substrats ont un groupe CH₂ adjacent au site de clivage (indiqué par une astérisque). DpaA, peptidoglycan mDAP-protein amidase. D'après Winkle *et al.* 2021.

Il a récemment été montré que chez *E. coli*, les PBPs de classe A étaient indispensables au maintien de l'intégrité de la paroi. En effet, d'une part la délétion de PBP1a est associée à un retard de croissance et à une lyse partielle des cellules (Vigouroux *et al.* 2020) ; et d'autre part, le triple mutant PBP1a/PBP1b/PBP2 présente une sensibilité 4 à 8 fois plus élevée aux β -lactames que la souche sauvage. Ce phénotype est corrélé avec la diminution des couplages 4 \rightarrow 3 et à l'accumulation des substrats pentapeptides des PBPs (Toth, Stewart, *et al.* 2022). Par ailleurs, Pasquina-Lemonche et ses collègues, ont observé que la machinerie du divisome (PBP2/FtsW) de *B. subtilis* synthétisait des anneaux de PG concentriques et ordonnés au septum, puis qu'un PG orienté de façon aléatoire y était progressivement inséré au cours de la maturation de la paroi cellulaire (Pasquina-Lemonche *et al.* 2020). Straume et ses collaborateurs ont proposé que la maturation du PG était due à l'activité des PBPs de classe A, fortifiant le PG néosynthétisé par le divisome, en y ajoutant du PG plus densément réticulé (Straume *et al.* 2021).

Les PBPs de classe B

PBP2 (MrdA) et PBP3 (FtsI) sont des enzymes monofonctionnelles à activité D,D-transpeptidase présentes respectivement dans l'élongasome et dans le divisome (Fig. 16). De fait, chez *E. coli* et *B. subtilis*, les PBP2 et PBP3 sont étroitement associées aux polymérases de PG de la famille SEDS et aux PBPs de classe A (Meeske *et al.* 2016). Ainsi chez *E. coli*, PBP1a, PBP2 et RodA font partie de la machinerie de l'élongasome ; tandis que PBP1b, PBP3 et FtsW font partie du divisome (Kysela *et al.* 2016). Il a été constaté que les PBPs de classe B formaient de véritables complexes avec les protéines SEDS. La formation des complexes PBP2/RodA et PBP3/FtsW permet ainsi d'associer l'activité glycosyltransférase des protéines SEDS et l'activité transpeptidase des PBPs monofonctionnelles de classe B (Taguchi *et al.* 2019).

La PBP2 d'*E. coli* est essentielle à l'élongation de la cellule et au maintien de sa forme, puisque son inhibition par le mécilliname, une β -lactamine, donne des cellules sphériques incapables de former des colonies (Spratt et Pardee 1975). La PBP3 d'*E. coli* est essentielle à la division cellulaire. En effet, l'inhibition de PBP3 provoque la filamentation des cellules (Cushnie *et al.* 2016; Cushnie *et al.* 2016), et l'inactivation de PBP3 est létale chez *A. baumannii* (Toth, Stewart, *et al.* 2022).

Les PBPs de classe C

Les PBPs de classe C sont des hydrolases régulant principalement le niveau de réticulation du PG. Elles sont soit dotées d'une activité D,D-endopeptidase (elles clivent la liaison entre le D-Ala⁴ et le mDAP³ des peptides-tiges réticulés) (Fig. 20.A), soit dotées d'une activité D,D-carboxypeptidase (elles éliminent les résidus D-Ala terminaux des peptides-tiges) (Fig. 20.A). Six des PBPs de classe C (PBP4, PBP4b, PBP5, PBP6, PBP6b et AmpH) ont une activité D,D-carboxypeptidase, tandis que trois (PBP4, PBP7 et AmpH) ont une activité D,D-endopeptidase (Peters *et al.* 2019; Typas *et al.* 2012). Par ailleurs, PBP4 possède également une activité transpeptidase, bien qu'elle fonctionne majoritairement comme une D,D-endopeptidase (Basuino *et al.* 2018; Maya-Martinez *et al.* 2019). Curieusement, aucune des PBPs de classe C ne semble essentielle à la viabilité d'*E. coli* (Denome *et al.* 1999). Elles jouent toutefois un rôle important dans la morphologie de la cellule, puisque en l'absence de la principale D,D-

carboxypeptidase, PBP5, la cellule possède un diamètre supérieur à la souche sauvage (Nelson *et al.* 2000). Par ailleurs, la PBP6b contribue de manière substantielle au remodelage de la PG et au maintien de la forme cellulaire dans les cellules se développant à un pH acide (Peters *et al.* 2016)

2) Les L,D-transpeptidases, ou Ldts

Les Ldts ont d'abord été identifiées chez les souches d'*Enterococcus faecium* résistantes à l'ampicilline (Mainardi *et al.* 2002). Elles font partie de la famille des protéines YkuD. Cette famille de protéines était initialement appelée ErfK/YbiS/YcfS/YnhG, mais a été renommée d'après la première Ldt caractérisée structurellement, YkuD de *B. subtilis* (Biarrotte-Sorin *et al.* 2006). La deuxième Ldt caractérisée structurellement Ldt_{fm} d'*E. faecium* en 2006 (Biarrotte-Sorin *et al.* 2006; Bielnicki *et al.* 2005) (Fig. 23.B). Ces protéines sont retrouvées chez de nombreuses espèces bactériennes, tant chez les bactéries à Gram-négatif que chez les bactéries à Gram-positif et les Mycobactéries. Par exemple, *E. coli* possède 5 Ldts, *B. subtilis* possède deux Ldts YkuD et YciB (Bramkamp 2010; Dik *et al.* 2021; Zhao *et al.* 2017), *M. tuberculosis* possède 5 Ldts, Ldt_{Mt1-5} et *M. smegmatis* en possède 6 (LdtA à F). Le nombre de Ldts est variable au sein même des protéobactéries : *A. tumefaciens* possède 14 Ldt prédites ; *Legionella pneumophila* et *Coxiella burnetii* en possèdent 8. Les bactéries *Neisseria gonorrhoeae*, *Helicobacter pylori* et *Campylobacter jejuni* possèdent une seule Ldt (Godessart *et al.* 2021; Sandoz *et al.* 2021).

Le domaine catalytique YkuD

Le domaine YkuD possède un motif conservé HXX₁₄₋₁₇[S/T]HGChN qui contient trois résidus analogues à la triade catalytique des protéases à cystéines : une cystéine, une histidine et une glycine indépendante du pH (Erdemli *et al.* 2012; Lecoq *et al.* 2013) (Fig. 21.A et 22.A). La cystéine catalytique est invariable chez les membres de cette famille. Par ailleurs, on peut noter que le groupement thiol de la cystéine des Ldts est plus électro-négatif que le groupement hydroxyle de la sérine catalytique des PBPs. En conséquence, la cystéine est moins nucléophile que la sérine, car l'atome de soufre est moins apte à céder ses électrons que l'atome d'oxygène, et donc moins apte à former une liaison avec un autre atome. Il a été proposé sur la base de modèles structuraux, que les résidus de la triade catalytique des Ldts se trouvent sous une longue boucle (Fig. 22.B). Cette boucle constitue un couvercle qui peut s'ouvrir et se fermer pour créer deux cavités, une interne et une externe, autour de la cystéine catalytique. Ces deux cavités sont connectées par un tunnel étroit (Fakhar *et al.* 2017). Ces cavités externes et internes seraient des sites accueillant respectivement les tétra-peptides-tiges « donneurs » et « accepteurs » d'acyl (Erdemli *et al.* 2012). Des carbapénèmes se fixent sur ces deux cavités en formant une liaison covalente avec le résidu cystéine catalytique de la Ldt, étant donné que les antibiotiques de la classe des β -lactames miment le tétra-peptide-tige du PG (Bianchet *et al.* 2017; Kumar *et al.* 2017). Chez *E. coli*, les Ldts ne sont pas indispensables à la croissance en conditions de laboratoire puisque le mutant dépourvu des 5 Ldts identifiées (LdtA, LdtB, LdtC, LdtD, et LdtE, ou respectivement, ErfK, YbiS, YcfS, YcbB et YnhG) est viable (Magnet *et al.* 2008).

L,D-endopeptidase et autres protéines de la famille YkuD

Les hydrolases de la famille YkuD sont une découverte récente (Bahadur *et al.* 2021; Winkle *et al.* 2021). Cette famille est représentée par LdtF (anciennement YafK ou encore DpaA) chez *E. coli* (Fig. 21.A et 21.B). Malgré la présence d'un domaine catalytique YkuD (33 % et 41 % d'identité de séquence avec le domaine catalytique YkuD de LdtD et de LdtE), ainsi qu'une cystéine catalytique, LdtF ne possède pas d'activité transpeptidase (Magnet *et al.* 2008; Morè *et al.* 2019). En effet, le second résidu après la cystéine catalytique LdtF est un résidu alanine (A) ou asparagine (N) à la place du résidu arginine (R) (CIR→CIA) retrouvé chez les transpeptidases YkuD (Bahadur *et al.* 2021; Winkle *et al.* 2021) (Fig. 21.A). De fait de ce changement de résidu, ces enzymes ne sont pas des transpeptidases responsables du couplage covalent de peptides-tiges ou de Lpp au PG, mais sont des L,D-endopeptidases hydrolysant la liaison amide entre le m-Dap³ et le Gly⁴ d'un térapeptide-tige (carboxypeptidase) ou entre le mDap³ et la Lys⁵⁸ C-terminale de Lpp (endopeptidase) (Winkle *et al.* 2021) (Fig. 21.B). Ainsi, LdtF est responsable du détachement de Lpp du PG et régulerait la formation des couplages covalents entre la ME et le PG (Bahadur *et al.* 2021). Par ailleurs, la présence d'homologues de LdtF chez des bactéries ne possédant pas Lpp suggère qu'elle aurait d'autres substrats chez ces espèces (Winkle *et al.* 2021). De plus, l'analyse de la composition du PG chez des mutants de *ldtD*, *ldtE* et *ldtF* chez *E. coli* a montré que l'action de LdtF stimulait l'activité de couplages 3→3 réalisés par LdtD et LdtE (Morè *et al.* 2019). En conséquence, le niveau de couplages 3→3 du PG augmente lors de la co-expression de LdtF avec LdtD ou LdtE (Montón Silva *et al.* 2018; Morè *et al.* 2019). Ceci suggère le rôle important du remodelage des couplages du PG pour l'activité des Ldts, ce qui rejoint les observations de Voedts et ses collaborateurs (Voedts *et al.* 2021). En effet, l'action de LdtF permettrait un remodelage dynamique du PG au cours du cycle cellulaire. Le détachement de Lpp du PG serait bénéfique pour les bactéries dans certaines conditions de stress, notamment en présence de mécilinamide, et devient essentiel lorsque l'export de LPS à la ME est compromis (Winkle *et al.* 2021). De manière intéressante, les homologues de LdtF sont présents chez les nombreuses bactéries à Gram-négatif dont certaines ne possèdent pas Lpp. Chez ces bactéries, LdtF pourrait agir sur certaines autres protéines non encore identifiées. LdtF est également impliquée dans la formation de biofilms chez *E. coli* EAEC (Sheikh *et al.* 2001).

Les enzymes possédant un domaine catalytique de la famille YkuD ne sont pas toutes des Ldts. En effet, ElsL, une enzyme possédant un domaine YkuD mais dépourvue de peptide-signal a récemment défini une toute nouvelle classe de L,D-carboxypeptidase cytoplasmique, une enzyme critique dans le recyclage du PG (Dai *et al.* 2021). ElsL a une activité carboxypeptidase *in vitro* catalysant l'élimination du D-Ala⁴ terminal des térapeptides mais pas des pentapeptides. La délétion du gène *elsL* entraîne l'accumulation de térapeptides ne pouvant pas être utilisés comme peptides-donneurs 4→3 par les PBP. Seules les Ldts peuvent prendre en charge les térapeptides dans une réticulation 3→3 pour assurer la réticulation du PG dans un mutant *elsL* (Fig. 20.B). De fait, cela explique que le double mutant *elsL ldt_{Ab}* ne soit pas viable, et que la surexpression de Ldt_{Ab} restaure partiellement les phénotypes du mutant *elsL*. Le mutant *elsL* est caractérisé par la perte de la forme allongée de la bactérie, l'altération de la croissance, une hypersensibilité aux antibiotiques ciblant la paroi cellulaire septale, et des défauts

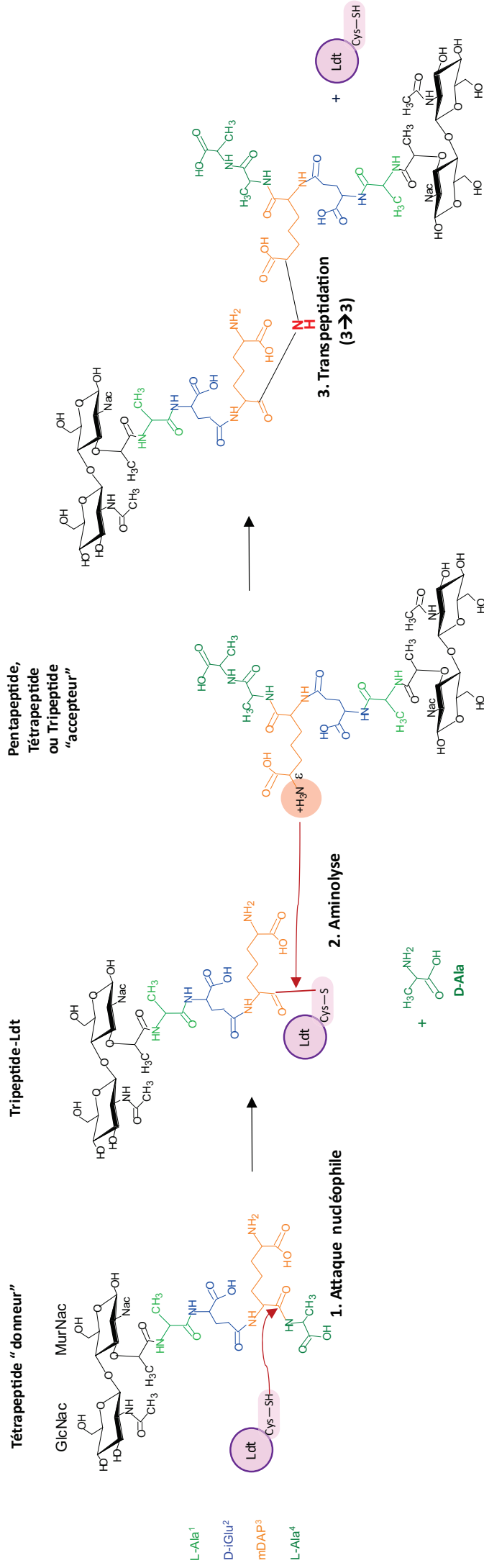


Figure 20. B. Mécanisme de transpeptidation réalisé par les Ldts. 1. La cystéine catalytique de la Ldt réalise une attaque nucléophile sur le carbonyle de la liaison peptidique entre le mDAP³ et le L-Ala⁴ d'un tétrapeptide-tige « donneur ». Lors de la réaction le D-Ala⁴, nucléofuge est éliminé (en vert) ce qui aboutit à la formation d'un complexe acyle-enzyme formé par la Ldt et un tripeptide-tige. 2. Le complexe acyle-enzyme subit une aminolyse par l'amine d'un résidu L-Lys³ (Gram-positif) ou mDAP³ (Gram-négatif) d'un peptide-tige (penta-, tétra- ou tripeptide-tige « accepteur »). 3. Cela aboutit à la transpeptidation mDAP³→mDAP³(3→3) d'un tripeptide-tige à un peptide-tige adjacent. Chez *E. coli* cette réaction est catalysée par LdtD et LdtE (Magnet *et al.* 2008).

structurels de la paroi cellulaire, y compris une augmentation des liaisons 3→3 avec une réduction de la réticulation globale du PG. Ces phénotypes sont similaires à ceux d'un mutant *rod*, la machinerie cellulaire de l'élongation, ce qui suggère une relation entre le système de recyclage du PG et l'élongation cellulaire (Dai *et al.* 2021).

a. Les L,D-transpeptidases (Ldts) sont responsables de la réticulation 3→3 du PG et de l'attachement de la lipoprotéine de Braun (Lpp) au PG chez *E. coli*

La transpeptidation réalisée par les Ldts (Interpro IPR005490) aboutit au couplage 3→3 de deux peptides-tiges adjacents (Fig. 20.B). Le mécanisme de transpeptidation diffère sensiblement de celui de PBPs car les résidus catalytiques, les substrats et les produits de la réaction sont différents (Fig. 20.A et 20.B). La cystéine catalytique des Ldts réalise une attaque nucléophile sur la liaison mDAP³-D-Ala⁴ du substrat térapeptide-tige « donneur » (Hugonnet *et al.* 2016; Magnet *et al.* 2008; Mainardi *et al.* 2005). Cette réaction entraîne le départ concomitant du résidu D-Ala⁴ du térapeptide-tige (activité carboxypeptidase) et entraîne la formation d'un complexe entre l'enzyme et le résidu mDAP³ du tripeptide-tige « donneur ». Le complexe acyle-enzyme subit par la suite une hydrolyse par l'amine primaire d'un résidu mDAP³ ou Lys³ (aminolyse) d'un peptide-tige adjacent appelé peptide « accepteur ». Ceci mène à la formation d'une liaison peptidique 3→3 (mDAP³-mDAP³) entre le mDAP³ d'un peptide-tige « donneur » et le mDAP³ ou Lys³ d'un peptide-tige « accepteur » (Fig. 20.B). Étant donné que la fonction amine est portée par le 3^e résidu du peptide-tige, les penta-, tétra- ou tripeptide-tige le possédant peuvent tous jouer le rôle d'« accepteur » d'acyle dans la réaction de transpeptidation.

De manière générale, chez *E. coli*, les liaisons 3→3 sont moins abondantes que les liaisons 4→3 au sein du PG en phase exponentielle de croissance (6 à 7 % contre 93 à 94 % pour les PBPs). Toutefois, le pourcentage de couplages 3→3 augmente jusqu'à 13 % en phase stationnaire (Lavollay *et al.* 2008), et ceux-ci sont plus abondants en conditions de stress, lorsque le remodelage ou le renforcement du PG est indispensable. Par exemple, en présence d'antibiotiques de groupe β-lactames, les couplages 3→3 deviennent cruciaux pour la survie de la bactérie. Cependant, chez les Mycobactéries et les Clostridiales, les liaisons 3→3 sont majoritaires, 60 à 80% (Bern *et al.* 2017; Lavollay *et al.* 2008; Peltier *et al.* 2011). Bien que les Mycobactéries possèdent six Ldts (LdtA à F) et que leur PG contient 80 % de couplages 3→3, seule LdtC est majoritairement responsable de ces couplages (Sanders *et al.* 2014). La délétion de *ldtC* a le plus grand effet sur la sensibilité aux carbapénèmes de *Mycobacterium smegmatis* par rapport aux mutants manquant d'autres gènes *ldt* (Francis *et al.* 2023). Un mutant de *M. smegmatis* dépourvu des cinq gènes *ldtA, B, D, E, F* présente un phénotype sauvage, à l'exception d'une sensibilité accrue à la rifampicine. En revanche, un mutant dépourvu des six gènes *ldt*, dont *ldtC*, présente des multiples défauts de l'enveloppe : il est sensible à la température et à divers antibiotiques. Ces résultats indiquent que LdtC est capable de fonctionner comme la seule Ldt chez *M. smegmatis* (Francis *et al.* 2023). Les couplages 3→3 confèrent certains avantages à la survie de la bactérie.

L,D-transpeptidases responsables de la réticulation 3→3 du PG

L'analyse du PG de mutants *ldt* d'*E. coli* par HPLC-MS a montré que la délétion des gènes *ynhG* (*ldtE*) et *ycbB* (*ldtD*) a aboli la formation de liaisons 3→3 entre les peptides-tiges (Magnet *et al.* 2008). LdtD (YcbB) et LdtE (YnhG) sont donc responsables de la réticulation 3→3 du PG chez *E. coli* (Fig. 20.A). Cependant, en conditions de culture en milieu liquide, les couplages 3→3 ne semblent pas être indispensables. En effet, la délétion des deux gènes de Ldts impliqués dans les couplages 3→3 chez *E. coli* *ynhG* (*ldtE*) et *ycbB* (*ldtD*) (Magnet *et al.* 2008) n'a provoqué aucun défaut visible de croissance en conditions de laboratoire (Sanders *et Pavelka* 2013). Par ailleurs, le suivi de l'expression de Ldts d'*E. coli* par fluorescence a montré que l'incorporation d'acides-aminés fluorescents est dépendant du pH. En effet, LdtD serait fonctionnelle à pH 7 mais pas à pH 5, contrairement à LdtE qui est plus active à pH 5 qu'à pH 7 (Montón Silva *et al.* 2018). LdtE est une Ldt de ménage capable de former des liaisons 3→3 tout le long du cycle cellulaire de la bactérie, mais nécessite la coopération de LdtF (Morè *et al.* 2019). LdtE est particulièrement active en phase stationnaire car *ldtE* et *ldtF* y ont une expression maximale. En effet, l'expression de *ynhG* et *yafK* est contrôlée par RpoS, le facteur sigma alternatif pour l'expression des gènes en phase stationnaire (Battesti *et al.* 2011; Morè *et al.* 2019; Weber *et al.* 2005). De même, Ldt_{Pae1} de *P. aeruginosa*, l'homologue de LdtE (YnhG) d'*E. coli*, n'est pas capable de former des liaisons 3→3 en cas d'inhibition des PBP par les β-lactames (Hugonneau-Beaufet *et al.* 2023; Hugonnet *et al.* 2016).

Comme vu précédemment, le couplage 3→3 du PG est associé à une résistance accrue de la bactérie aux antibiotiques de la classe des β-lactames (Mainardi *et al.* 2005). Bien les deux enzymes LdtD et LdtE soient capables de former des liaisons 3→3 dans le PG, seule LdtD est impliquée dans la formation de liaisons 3→3 en condition de stress (Morè *et al.* 2019). Chez *E. coli*, la sélection de mutants résistants à la ceftriaxone, un β-lactamine de la classe des céphalosporines, entraîne un contournement de l'activité des PBPs par celle de la LdtD (YcbB) (Hugonnet *et al.* 2016), et permet ainsi la survie de la bactérie. LdtD est induite par la réponse au stress de l'enveloppe via le système CpxAR (Delhaye *et al.* 2016) (Fig. 11.b). Cette réponse est induite lorsque l'intégrité de la ME est compromise, notamment chez un mutant *lptC* pour lequel la synthèse et l'adressage de LPS à la ME est interrompue (Bernal-Cabas *et al.* 2015), chez le double mutant *ldtE ldtF* ou encore lors de l'utilisation d'antibiotiques de la classe des β-lactames (Morè *et al.* 2019). Dans le cas de l'activation du système CpxAR, l'expression de LdtD prévient la lyse de la cellule en augmentant la proportion de couplages 3→3 au sein du PG. Chez *E. coli*, l'expression de YcbB (LdtD) permet ainsi de remplacer en partie l'activité des cinq PBPs de classe A et B, et serait à elle seule responsable de la résistance aux β-lactames (Hugonnet *et al.* 2016). Toutefois, Hugonnet et ses collaborateurs ont identifié que la production des alarmes nucléotidiques (p)ppGpp (guanosine tétra- ou penta-phosphate) synthétisées par RelA était indispensable au remplacement fonctionnel des PBPs, en permettant à la bactérie de résister à une large gamme de β-lactames. (p)ppGpp déclenche la réponse stringente, une réponse au stress largement conservée qui contrôle l'adaptation de la bactérie à la privation de nutriments. Cette réponse est activée par un certain nombre de signaux de stress, y compris les stress nutritionnels (Hauryliuk *et al.* 2015). (p)ppGpp joue un rôle clé dans la réponse au stress et l'entrée de la cellule en quiescence lorsque celle-ci rencontre des conditions défavorables à sa croissance. Les mécanismes directs reposent sur la liaison de l'alarme à une cible moléculaire et sur sa régulation,

tandis que les mécanismes indirects reposent sur les changements dans les concentrations de GTP et d'ATP, provoqués par la production de (p)ppGpp. Par exemple, la synthèse de (p)ppGpp inhibe la réplication de l'ADN, la biosynthèse du GTP et la transcription, sa cible principale (Diez *et al.* 2020). Chez *E. coli*, cette régulation repose sur la liaison directe de l'alarmone aux sous-unités β' - et ω de l'ARN polymérase (RNAP), tandis que chez *B. subtilis*, la régulation est indirecte et repose sur les changements de concentration du nucléotide initiateur. Outre la transcription, la production de (p)ppGpp régule plusieurs autres processus cellulaires, tels que la biosynthèse des protéines (en réduisant la biogenèse des ribosomes), la réplication, la réponse au stress acide, le métabolisme des polyphosphates, la biosynthèse et l'absorption des nucléotides et (par le biais d'une interaction directe avec RelA). Les effets de la (p)ppGpp couvrent un continuum allant des réponses de survie aiguës provoquées par des stress tels que la privation de nutriments ou le choc thermique, médiées par des niveaux élevés de (p)ppGpp, au rôle "d'entretien" des niveaux basaux de (p)ppGpp dans les processus métaboliques normaux, tels que la production d'acides aminés et de nucléotides. La surproduction de l'alarmone est aussi connue pour réguler le taux de croissance bactérien et des réponses aux stress liées à l'exposition aux antibiotiques. En effet, (p)ppGpp joue un rôle clé dans la virulence et la persistance bactériennes (formation de cellules tolérantes aux antibiotiques) (Hauryliuk *et al.* 2015). C'est pourquoi il a récemment été mis au point des inhibiteurs spécifiques de ce processus, qui constituent un point de départ pour le développement futur de nouveaux composés anti-virulence. En effet, la surproduction de (p)ppGpp dans un mutant *ycbB* augmente la tolérance à l'ampicilline en diminuant d'un facteur 1000 le taux de mortalité des cellules. De plus, la surexpression de l'alarmone induit la résistance à la mécilline (β -lactame) et à des antibiotiques non β -lactames comme la cirpofloxacine qui agit sur l'ADN topoisomérase. Il a d'ailleurs déjà été montré que l'expression hétérologue de YcbB dans un mutant *ycbB relA* ne synthétisant pas l'alarmone (p)ppGpp, ne permet pas de contourner l'effet des β -lactames, tandis que l'expression hétérologue de YcbB et RelA mène à la résistance à une large gamme de β -lactames (Hugonnet *et al.* 2016). La même étude a permis de localiser l'activité d'YcbB (LdtD), grâce à l'utilisation d'un dérivé fluorescent de D-Ala. L'analyse de la fluorescence au niveau de deux cellules en division suggère que LdtD et ses substrats tétrapeptides sont préférentiellement localisés au septum (Hugonnet *et al.* 2016). Néanmoins, en condition où YcbB (LdtD) est la seule transpeptidase fonctionnelle dans la cellule, celle-ci nécessite l'action préalable d'enzymes partenaires fournissant le substrat tétrapeptidique et permettant la synthèse et l'élongation du PG. En effet, l'activité glycosyltransférase d'une enzyme partenaire est indispensable à l'élongation de chaînes de glycanes, puisque YcbB ne possède pas de domaine glycosyltransférase. Ainsi, d'une part, PBP5 (DacA), la D,D-carboxypeptidase principale chez *E. coli* génère les tétrapeptides substrats d'YcbB (Hugonnet *et al.* 2016). En raison de sa faible affinité pour les β -lactamines, PBP5 est capable de conserver son activité à des concentrations de β -lactamines inhibant les autres PBPs. En revanche, elle est inhibée à de fortes concentrations de β -lactames (Caveney *et al.* 2019). D'autre part, la PG synthase majeure chez *E. coli*, PBP1b, possède à la fois une activité D,D-transpeptidase et une activité glycosyltransférase stimulée par LpoB (Markovski *et al.* 2016). Or, les β -lactames inhibent le domaine transpeptidase, mais pas le domaine glycosyltransférase de PBP1b, ce qui permet l'élongation des chaînes de glycanes en présence d'antibiotique. De fait, PBP1b, LpoB et PBP5 sont essentielles à l'activité enzymatique de YcbB en présence de β -lactames (Hugonnet *et al.* 2016). Par

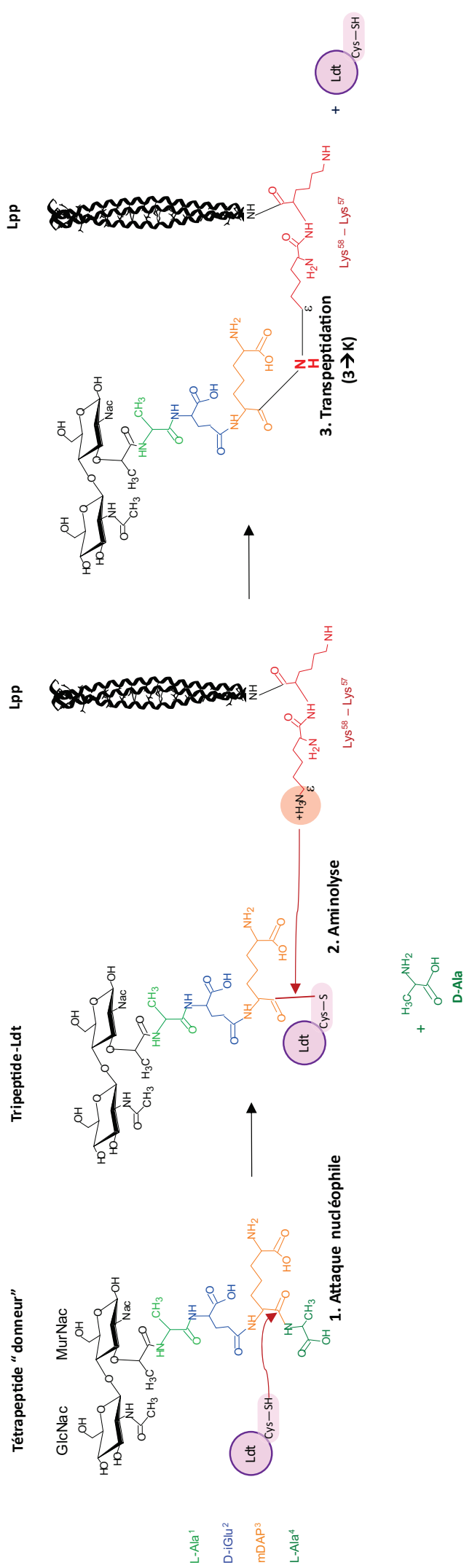


Figure 20. C. Couplage de Lpp au PG par les Ldts. 1. La cystéine catalytique de la Ldt réalise une attaque nucléophile sur le carbonyle de la liaison peptidique entre le mDAP³ et le L-Ala⁴ d'un tétrapeptide-tige « donneur ». Lors de la réaction le D-Ala⁴, nucléofuge est éliminé (en vert) ce qui aboutit à la formation d'un complexe acyle-enzyme formé par la Ldt et un tripeptide-tige. 2. Le complexe acyle-enzyme subit une aminolyse par le groupement ε-amine d'un résidu Lys⁵⁸ de Lpp (en rouge), qui joue le rôle d'« accepteur ». 3. Cela aboutit au couplage mDAP³ → Lys⁵⁸ → Lys⁵⁷ d'un tripeptide à Lpp. Chez *E. coli* cette réaction est catalysée par LdtA, LdtB et LdtC (Magnet *et al.* 2007).

ailleurs, des expériences de pontage chimique suivies d'immunoprécipitation suggèrent que LdtD et PBP1b forment un complexe (Morè *et al.* 2019). Ainsi, lors de défaut majeur de l'assemblage de la ME, dans un mutant *lptC*, YcbB (LdtD) interagit physiquement avec PBP1b pour restaurer l'intégrité du saccule (Morè *et al.* 2019). Les raisons de la formation d'un tel complexe n'ont pas été explorées à ce jour. On peut néanmoins suggérer que le rapprochement spatial de PBP1b et de LdtD au niveau du PG favorise la succession coordonnée des activités glycosyltransférase et carboxypeptidase de PBP1b, ainsi que l'activité transpeptidase de YcbB (LdtD), permettant une mise en place rapide et efficace des couplages 3→3 au sein du PG. Ainsi, PBP1b incorpore les disaccharides pentapeptides au PG par l'activité glycosyltransférase, puis régénère des tétrapeptides qui sont, rapidement prises en charge par LdtD pour générer des couplages 3→3. Un modèle similaire a été proposé par Morè concernant l'élongation du PG par la coopération de YcbB et la D,D-carboxypeptidase PBP6a, permettant de renforcer le PG en réponse au défaut de synthèse de la ME dans le contexte de délétion de *lptC* (Morè *et al.* 2019). C'est probablement pour cette même raison que les domaines de glycosyltransférase et de transpeptidase sont naturellement fusionnés au sein d'une seule protéine, comme c'est le cas chez les PBPs de classe A. Par ailleurs, le suivi l'activité de LdtD par radiomarquage de lipide II a révélé que LdtD préfère le PG naissant nouvellement synthétisé par PBP1B, et dont le D-Ala⁵ a été clivé par PBP6a (Morè *et al.* 2019). Ainsi, la LdtD est capable de coopérer avec l'activité glycosyltransférase de PBP1B et des D,D-carboxypeptidases pour utiliser les PG naissants comme substrat, ce qui est cohérent avec un rôle dans le remodelage du PG lors des défauts d'assemblage de la ME (Morè *et al.* 2019).

Dans de nombreuses situations de stress (limitation des nutriments, limitation d'azote, températures élevées, choc froid), le PG est remodelé par YcbB, ce qui confère une meilleure résistance et une meilleur fitness à la bactérie (Nallamotu *et al.* 2023). Par exemple, en cas d'exposition aux β-lactames, le niveau de liaisons 3→3 réalisées par LdtD est augmenté, ce qui renforce le PG et permet d'éviter la lyse de la cellule (Morè *et al.* 2019). LdtD ne serait pas la seule enzyme indispensable à une telle réponse adaptée, mais il semblerait plutôt que le remodelage du PG soit une action concertée de plusieurs enzymes comme PBP1B, son activateur LpoB, et la carboxypeptidase PBP6a (Morè *et al.* 2019). De plus, chez *E. coli*, le choc froid en phase exponentielle provoque un remodelage du PG par LdtD (YcbB), dont la traduction est facilitée par l'ARN hélicase DeaD, elle-même induite par le choc froid (Nallamotu *et al.* 2023). Ces exemples démontrent la polyvalence et la robustesse du processus de synthèse du PG.

Ldts impliquées dans la le couplage covalent de Lpp au PG

Dans le chapitre précédent, nous avons vu que le groupement amine du 3^e résidu (mDAP³ ou Lys³) du peptide « accepteur » était indispensable à l'aminolyse lors de l'étape de transpeptidation. Elle permet la formation de liaison 3→3 au sein du PG. Autrement dit, un peptide peut être « accepteur » s'il possède une amine libre au niveau du mDAP³ ou Lys³. Néanmoins le peptide-tige n'est pas le seul substrat « accepteur » d'acyle des Ldts. Les protéines, comme la lipoprotéine de Braun (Lpp) possédant une lysine C-terminale peuvent se substituer au peptide « accepteur » et ainsi former une liaison covalente entre le groupe ε-amine de la lysine et le groupe carbonyle du mDAP³ avec un peptide-tige « donneur » mDAP³→Lys⁵⁸ (Lpp) (Braun *et Rehn* 1969) (Fig. 20.C).

A cause de la synténie de gènes *ynhG* (*ldtE*) et *lpp* sur le chromosome d'*E. coli*, on a pu penser que YnhG (LdtE) serait impliquée dans le couplage de Lpp au PG (Asmar et Collet 2018). Néanmoins, chez *E. coli*, les LdtA, LdtB et LdtC (ErfK, YbiS et YcfS) sont responsables du couplage de Lpp au PG, mais ne sont pas impliquées dans la réticulation du PG (Magnet *et al.* 2007). Chez *E. coli*, LdtA est présente en 70 copies chez *E. coli*, LdtB en 5000 copies et LdtC en 500 copies (Li *et al.* 2014). Magnet et ses collaborateurs ont montré qu'en conditions de laboratoire, le couplage de Lpp au PG était aboli dans le mutant *ldtB* (Magnet *et al.* 2007). Ainsi, pour son nombre de copies plus important, LdtB serait majoritairement responsable du couplage de Lpp au PG en phase exponentielle de croissance et en conditions de laboratoire (Asmar et Collet 2018; Li *et al.* 2014). La délétion des gènes de trois Ldts impliquées dans le couplage de Lpp au PG est associée à de nombreux défauts de l'enveloppe comme la déstabilisation de la ME, une sensibilité accrue à l'EDTA, et une augmentation de la perméabilité de la ME. Les bactéries présentant ces défauts sont toutefois viables (Sanders et Pavelka 2013). Bien que les Ldts soient insensibles à l'action des β -lactames, Voedts et ses collaborateurs ont montré que les β -lactames empêchaient l'attachement de Lpp au PG, et que l'exposition à la ceftriaxone (une céphalosporine de 3^e génération) augmentait la perméabilité de la ME (Voedts *et al.* 2022). Les auteurs proposent que les dommages à la ME sont causés par les espèces réactives de l'oxygène (ROS), puisque une peroxydation lipidique accrue a été détectée dans les conditions d'anabolisme important du PG lors de l'inactivation des PBPs par la ceftriaxone (Voedts *et al.* 2022).

b. Quel est l'impact de l'activité des Ldts sur l'intégrité de l'enveloppe ?

L'intégrité de l'enveloppe est cruciale pour la survie de la bactérie. Celle-ci peut être évaluée grâce à l'exposition de la ME à divers composés chimiques comme l'EDTA (qui chélate les ions Mg^{2+} du LPS et prévient la stabilisation de la ME), ainsi que le SDS ou les sels biliaires qui solubilisent les membranes par leur activité détergent (Lazzaroni et Portalier 1981; Sanders et Pavelka 2013). L'importance du rôle des Ldts dans la stabilisation de l'enveloppe peut être testée par utilisation de ces composés chimiques. Chez *P. aeruginosa*, la délétion du gène codant pour la Ldt_{Pae2} impliquée dans le couplage de l'homologue de Lpp (d'OprI) au PG, cause un phénotype similaire à la délétion du gène *oprI* (Hugonneau-Beaufet *et al.* 2023). L'enveloppe des mutants *oprI* ou *ldt_{Pae2}* est déstabilisée. Cela se traduit par une sensibilité accrue à l'EDTA, à cause de la perte de la lipoprotéine OprI ou de son attachement covalent au PG. Ces phénotypes ne sont pas observables chez les mutants *ldt_{Pae1}* et *ldt_{Pae3}*, car les protéines correspondantes sont respectivement impliquées dans la réticulation 3→3 du PG et le détachement d'OprI du PG (Hugonneau-Beaufet *et al.* 2023), ce qui confirme les résultats similaires obtenus chez *E. coli* (Sanders 2013). La délétion de gènes *ldt_{Pae1}*, *ldt_{Pae2}*, *ldt_{Pae3}* chez *P. aeruginosa* impacte la formation de biofilms, mais pas la motilité (Hugonneau-Beaufet *et al.* 2023). Chez *P. aeruginosa*, le PG est formé de 44,2 % de couplages en condition biofilm, alors qu'il en est formé de 33,9 % en condition planctonique (Hugonneau-Beaufet *et al.* 2023). Ainsi, les conditions de biofilm semblent favoriser l'activité de Ldt_{Pae1}, unique Ldt responsable de la réticulation du PG chez *P. aeruginosa*. En effet, la proportion de dimères de PG attachés en 3→3 est de 11,3 % parmi tous les dimères chez *P. aeruginosa* en condition de biofilm, alors que le couplage 3→3 n'est pas détecté en phase exponentielle de croissance (Hugonneau-Beaufet *et al.* 2023). De plus, la proportion d'OprI

attachée de manière covalente au PG augmente significativement en condition de biofilm, comparé à la condition planctonique, indiquant que Ldt_{Pae2} est plus active dans ces conditions de croissance. Ainsi, l'étude des mutants *ldts* de *P. aeruginosa* et l'expression hétérospécifique des gènes *ldts* de *P. aeruginosa* chez *E. coli* indiquent que la formation de dimères 3→3 et l'ancrage des lipoprotéines sont respectivement médiés par Ldt_{Pae1} et Ldt_{Pae2}, tandis que Ldt_{Pae3} ne catalyse aucune des deux réactions (Hugonneau-Beaufet *et al.* 2023).

c. Redondance des Ldts

Les raisons de la présence de multiples copies de gènes Ldts chez *E. coli* comme chez certaines autres bactéries ne sont pas encore résolues. Une telle redondance pourrait être liée à des spécificités enzymatiques propres à chaque Ldt. Ainsi, diverses Ldt pourraient être spécialisées dans le couplage au niveau de régions spécifiques du PG. Par exemple, certaines Ldts seraient spécifiquement impliquées dans la reconnaissance d'un PG de composition particulière, tant en termes de maturation des chaînes de glycanes, qu'en composition en acides aminés des peptides-tiges. Elles localiseraient ainsi leur activité enzymatique davantage au septum ou dans certaines zones du PG nécessitant des couplages et des remodelages locaux. Ainsi, l'activité d'YcbB (LdtD) ainsi que ses substrats tétrapeptides ont été localisés au septum d'*E. coli*, grâce à la visualisation par la fluorescence d'un dérivé de D-Ala (Hugonnet *et al.* 2016; Montón Silva *et al.* 2018). Par ailleurs, la raison de la diversité des Ldts entre les espèces bactériennes serait due à la diversification de la composition du PG. Cette diversité associée à des événements de spéciation, aurait mené à l'évolution parallèle des Ldts, affectant la spécificité de substrat (notamment le peptide-tige accepteur d'acyle) (Magnet *et al.* 2008). En effet, la Ldt_{fs} d'*Enterococcus faecalis* est capable d'hydrolyser la liaison L-Lys³-D-Ala⁴ d'un tétrapeptide (L,D-carboxypeptidase) et d'un pentapeptide (L,D-endopeptidase), contrairement aux Ldt_{fm} et Ldt_{Bs} qui possèdent uniquement l'activité L,D-carboxypeptidase. Ainsi, les trois enzymes sont spécifiques de leur peptide-tige accepteur d'acyle. Cependant, Ldt_{fm} tolère la substitution L-Lys³-D-iAsn par L-Lys³-L-Ala-L-Ala dans le peptide-tige donneur et Ldt_{Bs} tolère la substitution mDAP³ par L-Lys³-D-iAsn et L-Lys³-L-Ala—Ala dans le peptide-tige donneur (Magnet *et al.* 2008). La redondance fonctionnelle de Ldts pourrait également résulter de l'adaptation des enzymes aux diverses conditions environnementales rencontrées par la bactérie, ou dans différentes conditions de croissance. Elles seraient ainsi exprimées différemment dans diverses conditions (Asmar et Collet 2018). Cela est par exemple illustré par l'activité optimale de LdtD et LdtE à pH 7 et pH 5, respectivement (Montón Silva *et al.* 2018), et que l'expression de *ynhG* s'effectue en phase stationnaire, sous le contrôle de RpoS (Battesti *et al.* 2011). Souvent, les fonctions très importantes sont assurées par la multiplication et/ou duplication de copies de gènes correspondants. Cette redondance permet des variations plus au moins importantes au niveau de la régulation transcriptionnelle et de leurs propriétés enzymatiques (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.* 2014). Ainsi une redondance apparente de Ldt chez protéobactéries peut refléter l'importance de ces enzymes pour la survie de bactéries.

A.

	$\beta 10$	$\beta 11$	360	$\beta 12$	$\alpha 12$	
	340	350	360	370	380	
<i>A. baumannii</i>	GNIWIGLS-KKS	FGIHGTPNPSLISK	-----	ASHGCI	IRITNWDANDLGN--	
<i>E. coli</i>	GRYKFNMPSS	EAIYLDHTPNHNLFKRD	TRA--	LSSGCV	RVN--KASDLAN--	
Gram - <i>V. cholerae</i>	GTYKFNTPN	SRAIYLDHTPSKHLFNN	ASRA--	FSSGCI	IRVE--NAEKFAQ--	
<i>C. rodentium</i>	GRYKFNMPSS	DAIYLDHTPNHTLF	SKDARA--	LSSGCV	RVN--KASELAN--	
<i>S. Typhi</i>	GRYKFNMPSS	DAIYLDHTPNHTLF	QRDARA--	LSSGCV	RVN--KASELAN--	
<i>K. pneumoniae</i>	GLYALYIG-RL-	YAIHG	TNANFGIGLR-----	VSHGCV	RLRNDDIKFLFE--	
Gram + <i>E. faecium</i>	VNYWMPID-W	TGVGIHDS	DWQPEYGGDLWKTRG	SHGCI	INTPPSVMKELFG--	
<i>B. subtilis</i>	GAYWLSLS-AA	HYG	IHG	TNNPASIGKA-----	VSKGCI	RMHNKDVIELAS--
<i>X. cellulolytica</i>	-WRPKYF--R	GGYAVH	GSS---SIPTYP----	ASHGCV	RVVSNAAMNWLWDSW	
<i>S. nassauensis</i>	-PYWQNF--N	NGEGLH	TTTT--YIHEPWI---	GSHGCV	NLLPSDSKCLYE--	

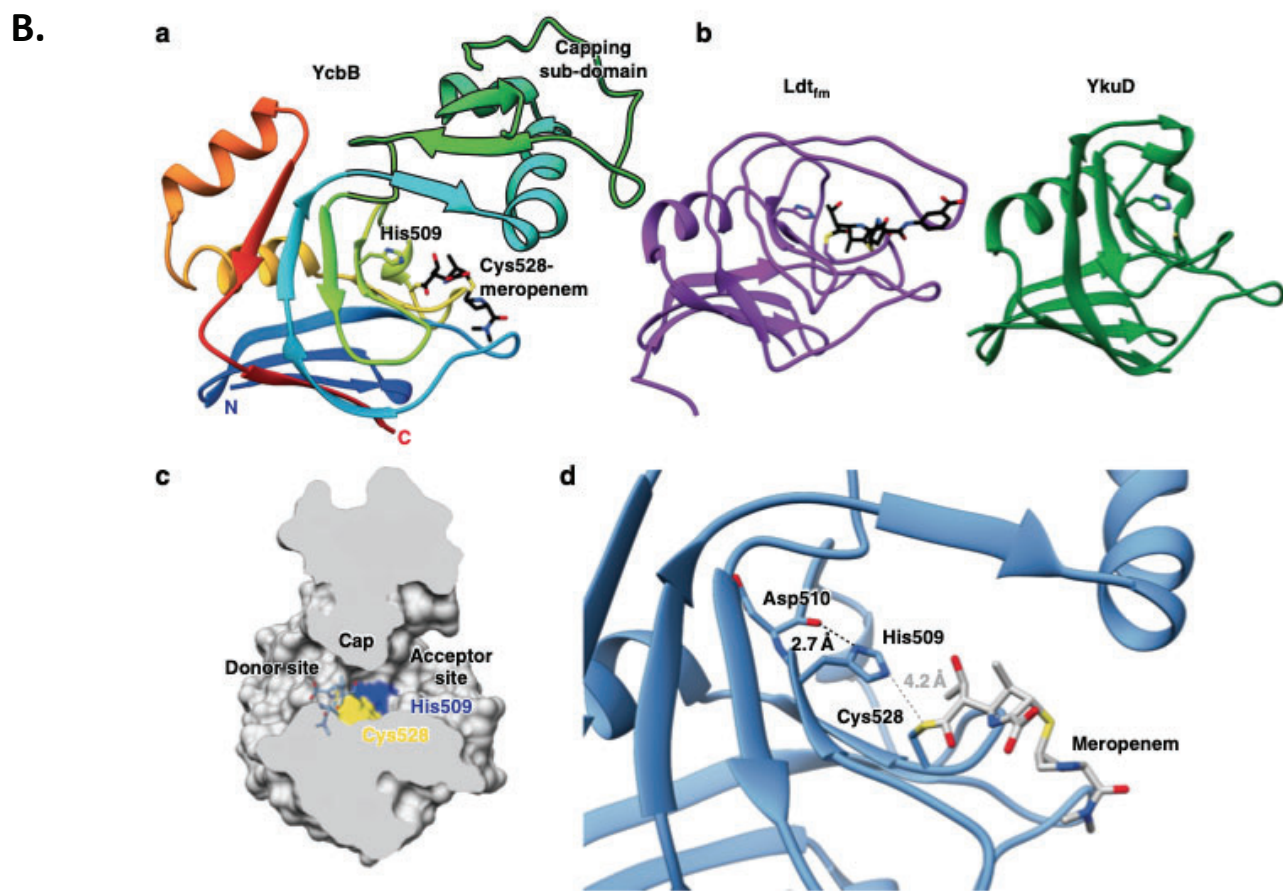


Figure 22. A. Alignement du site actif YkuD de quelques Ldts de bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif. Les deux résidus catalytiques sont surlignés en jaune. La structure secondaire et la numérotation des résidus de LdtAb d'*A. baumannii* sont indiquées au-dessus des séquences. Le motif catalytique YkuD est indiqué par l'encadré. **B. Structure du domaine catalytique d'YcbB (LdtD) d'*E. coli*.** **a.** Représentation en ruban du domaine catalytique d'YcbB (résidus 375-576 colorés en arc-en-ciel du bleu (N-terminus) au rouge (C-terminus)). Le méropénème est représenté en noir. **b.** L'architecture du domaine catalytique d'*Enterococcus faecium* Ldt_{fm} (PDB ID 3ZGP17) et de *Bacillus subtilis* YkuD (PDB ID 1Y7M13) met en évidence les différences observées entre les domaines catalytiques de L,D-transpeptidases dans la région de la boucle de coiffage. **c.** Représentation de la surface en coupe du domaine catalytique YcbB, montrant la fente coiffée formée entre les sites donneur et accepteur par le sous-domaine de la boucle de coiffage. Les Cys528 et His509 catalytiques sont colorés en jaune et en bleu respectivement. Le méropénème (bleu) est superposé à sa position dans le site donneur, acylant la cystéine catalytique. **d.** L'architecture du site actif d'*E. coli* YcbB. La Cys528 catalytique est acylée par le méropénème. D'après Caveney *et al.* 2020 et Toth *et al.* 2022.

d. Structure et domaines des Ldts

En raison de leur importance pour la survie de bactéries, notamment pour la stabilisation d'enveloppe et le contournement de la sensibilité aux β -lactames, Les Ldts ont fait l'objet de nombreuses études structurales. Ces travaux ont permis de mieux connaître le mécanisme catalytique de Ldts, de comprendre comment elles parviennent à contourner les antibiotiques de la classe des β -lactamines, et de comprendre les raisons de leur inhibition par les carbapénèmes. Jusqu'à récemment, 14 structures de Ldts ont été déterminées par cristallographie aux rayons-X (Aliashkevich et Cava 2022). Par ailleurs, de multiples structures de Ldts co-cristallisées avec des antibiotiques ou leur substrat NAG-NAM-tétrapeptide sont également disponibles sur RCSB-PDB (Bianchet *et al.* 2017; Lecoq *et al.* 2013; Zhao *et al.* 2019). A titre d'exemple, Caveney et ses collaborateurs ont récemment rapporté la structure d'YcbB (LdtD) d'*E. coli* co-cristallisée avec le méropénem acylé sur la cystéine catalytique, afin de comprendre le mode d'inhibition des Ldts par les carbapénèmes (Caveney *et al.* 2019).

Rappelons que toutes les Ldts possèdent un domaine catalytique de type YkuD avec un site actif conservé (HX₁₅₋₁₈[S/T]XGCh[R/N]), où 'X' représente n'importe quel acide-aminé, et 'h' un résidu hydrophobe (Fig. 22.A). La structure moléculaire du domaine YkuD possède une conformation consistant en un sandwich bêta avec deux feuilles mixtes, l'une contenant cinq brins et l'autre six brins. Les deux feuilles bêta forment une poche surmontée par une hélice alpha (Fig. 22.B). Les domaines YkuD peuvent être dupliqués ou perdre leur fonction initiale, au profit d'un rôle dans la liaison au PG. Par exemple, Ldt_{Pae1} de *P. aeruginosa* possède deux domaines catalytiques de la famille YkuD. Le premier domaine appelé Ldt_{Pae1} porte une cystéine catalytique (SHGCIR), tandis que le second, appelé Ldt_{Pae11} ne possède pas de résidu cystéine (QLGKIR) et ne serait pas fonctionnellement actif. Les auteurs ont suggéré que ce domaine serait impliqué dans la liaison au PG (Hugonneau-Beaufet *et al.* 2023).

Certaines Ldts possèdent des domaines supplémentaires impliqués dans des fonctions biologiques différentes. En effet, de nombreux enzymes de la famille YkuD possèdent des domaines de liaison non covalents au PG, impliqués dans la reconnaissance et l'attachement au PG par liaisons faibles (voir §IV). Les domaines de liaison au PG permettraient aux Ldts de se fixer à des régions particulières du PG, et y assurer une fonction spécifique vis-à-vis du PG comme la maintenance, le remodelage ou le couplage de peptides-tiges (Aliashkevich *et Cava* 2022; Morlot *et al.* 2005). Parmi les trois Ldts d'*E. coli* qui catalysent le couplage de Lpp au PG, Erfk, YcfS et YbiS (respectivement, LdtA, LdtB et LdtC, seule YcfS (LdtC) possède un domaine supplémentaire de liaison au PG, LysM (Winkle *et al.* 2021) (Fig. 21.A). LdtC n'étant pas la Ldt principalement impliquée dans le couplage de Lpp chez *E. coli* (Magnet *et al.* 2007), il se pourrait qu'elle soit active dans des conditions très particulières, qui restent encore à déterminer. LdtE (YnhG) d'*E. coli* possède également un domaine LysM, tandis que LdtD (YcbB) comporte trois domaines : un domaine catalytique de type YkuD possédant un sous-domaine en boucle-coiffe qui serait impliquée dans la liaison et la libération du substrat, un domaine de liaison non covalent au PG et un grand domaine d'échafaudage dans la région N-terminale potentiellement impliqué dans les interactions protéine-protéine avec les PBP5 et PBP1b (Caveney *et al.* 2019; Horita *et al.* 2014). La présence de domaines de liaison au PG sur au sein des enzymes impliquées dans la réticulation du PG renforce leur capacité à se lier au PG, comme cela a été démontré pour d'autres enzymes contenant

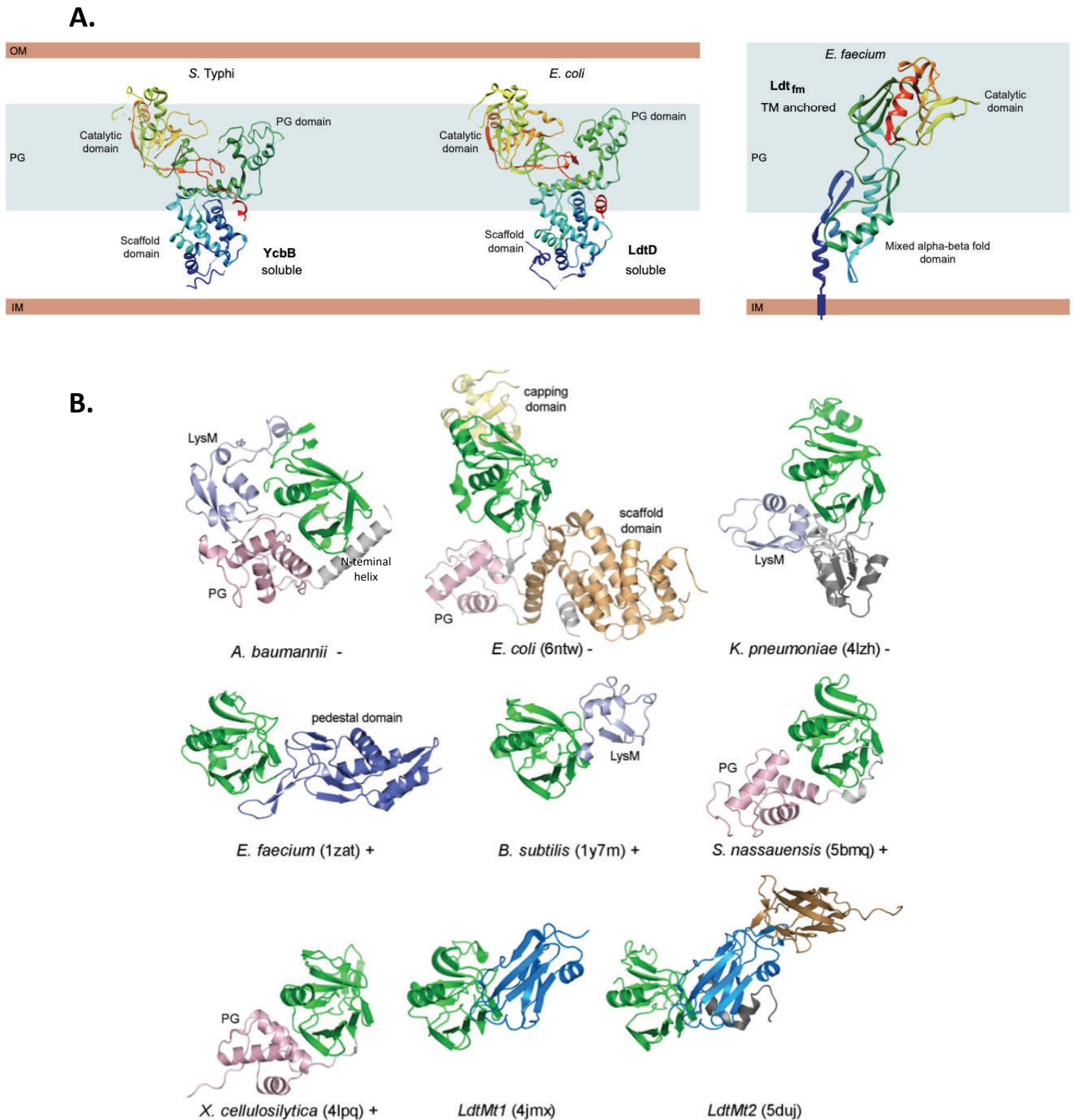


Figure 23. Comparaison structurale des Ldts de *S. Typhi*, *E. coli* et *E. faecium*. Les LdtD (YcbB) d'*E. coli* et de *S. Typhi* sont homologues. Elles partagent la même topologie (périplasmique) et l'organisation en domaines : un domaine catalytique YkuD, comprenant un sous-domaine de couverture du substrat, un domaine de liaison au PG, et un domaine d'échafaudage. La Ldt_{fm} d'*E. faecium* est ancrée à la MI par un segment transmembranaire. Ldt_{fm} se compose de deux domaines : un domaine N-terminal avec un repliement mixte alpha-bêta, et le domaine catalytique C-terminal. Les structures protéiques sont colorées en arc-en-ciel allant de l'extrémité N (bleu) à l'extrémité C (rouge). D'après Cava *et al.* 2022. **B. Diversité structurale des Ldts de différentes bactéries.** Les signes +/- à côté des noms indique si la bactérie est Gram - ou Gram +, excepté pour LdtMt1 et LdtMt2 de *Mycobacterium tuberculosis*. Les sites catalytiques sont colorés en vert, les domaines de liaison au PG sont en rose, les domaines LysM sont en bleu clair. Les domaines exclusifs à une seule enzyme sont représentés en gris clair ou gris foncé. D'après Caveney *et al.* 2020 et Toth *et al.* 2022.

plusieurs domaines LysM non apparentées aux Ldts, comme la glucosaminidase AtIA d'*Enterococcus faecalis* ou la kinase AtCERK1 d'*Arabidopsis thaliana* impliquée dans l'initiation de la réponse immunitaire (Mesnage *et al.* 2014). Par ailleurs, certains domaines additionnels permettent un ancrage de Ldts à la membrane cytoplasmique, par exemple un domaine transmembranaire de Ldt_{fm} chez *E. faecium* (Biarrotte-Sorin *et al.* 2006) (Fig. 23.A), ou encore l'ancre lipidique des Ldts lipoprotéines, Ldt_{Mt1} et Ldt_{Mt2} chez *M. tuberculosis* (Kumar *et al.* 2017; Rahman *et al.* 2008).

Il est intéressant de noter que la taille et la quantité de domaines additionnels peuvent varier chez les Ldts au sein d'une même espèce bactérienne (Fig. 21.A et 23.B). C'est par exemple le cas pour les cinq Ldts d'*E. coli*, évoquée ci-dessus. De telles variations peuvent refléter une certaine spécificité de chaque isoenzyme. Chez *Mycobacterium tuberculosis*, les cinq Ldts (Ldt_{Mt1-5}) ne partagent que 30 à 50 % d'identité de séquence, et quatre d'entre elles ont été caractérisées structuralement. Ldt_{Mt2} et Ldt_{Mt5} sont nettement plus longues que Ldt_{Mt1} et Ldt_{Mt3} (408 et 451 résidus vs 251 et 271 résidus respectivement) et possèdent un domaine supplémentaire immunoglobuline-like, appelé BlgA (Libreros-Zúñiga *et al.* 2019). Il a été proposé que ces domaines supplémentaires permettaient le positionnement optimal de la Ldt par rapport à son substrat. Par ailleurs, la Ldt_{Mt2} possède un site allostérique appelé S-pocket située à 21 Å du site catalytique permettant la fixation des résidus de glycane du PG. La présence d'un ligand dans la S-pocket influence la capacité du site catalytique à accueillir substrat. De plus, une molécule β-lactame peut être placée dans ce site de façon non covalente, en plus de celle couplée de façon covalente par le résidu catalytique (Ahmad *et al.* 2022).

La comparaison structurale des paralogues LdtD (YcbB) impliquées dans la réticulation du PG de quatre bactéries Gram-négatif *E. coli*, *C. rodentium*, *S. Typhi* et *V. cholerae*, montre qu'elles sont hautement similaires (Toth, Stewart, *et al.* 2022). Effectivement, les quatre micro-organismes appartiennent à la classe des γ-protéobactéries, tandis que les trois premiers, encore plus étroitement apparentés, appartiennent à la famille des entérobactéries. LdtD (YcbB) de ces bactéries sont des protéines solubles périplasmiques, et possèdent la même structure monomérique composée de trois domaines : un domaine catalytique de type YkuD possédant un sous-domaine en boucle-coiffe, un domaine de liaison non covalent au PG et un grand domaine d'échafaudage dans la région N-terminale (Fig. 23.A). Néanmoins, il est important de noter que toutes les Ldts impliquées dans la réticulation du PG ne partagent pas la même organisation (Fig. 23.A et 23.B). Bien qu'elle catalyse la réticulation du PG, la Ldt_{fm} d'*E. faecium* (Gram-positif) ne possède pas les mêmes domaines structuraux que celles de la LdtD (YcbB) d'*E. coli*. En effet, Ldt_{fm} est ancrée à la MI par un domaine transmembranaire et possède deux autres domaines : le domaine catalytique YkuD et un domaine composé de feuillets-β et l'hélices-α (mixed α-β fold) d'une fonction inconnue (Aliashkevich *et Cava* 2022; Biarrotte-Sorin *et al.* 2006; Caveney *et al.* 2019) (Fig. 23.A). Il semble probable que ces variations dans l'organisation structurale de ces homologues YcbB soient liées aux différences de l'enveloppe de ces bactéries (les Protéobactéries ou les Firmicutes, respectivement, à Gram-négatif ou à Gram-positif) ou encore à la composition de leurs peptides-tiges. Étonnamment, la structure de Ldt_{Ab} (effectuant la réticulation 3→3 du PG) chez la γ-protéobactérie *A. baumannii* est très différente en termes de taille, de composition et de disposition des domaines par rapport à YcbB (LdtD) d'*E. coli* (Fig. 23.B). En effet, Ldt_{Ab} est plus petite et comprend le domaine catalytique YkuD et le domaine de liaison au PG de type

PGBD, mais n'a pas de domaine d'échafaudage. En outre, elle possède un deuxième domaine de liaison au PG de type LysM qui, jusqu'à présent, n'a été identifié que dans deux autres Ldts impliquées dans la réticulation du PG : YbiS de *K. pneumoniae* (Gram-négatif), un homologue d'YbiS d'*E. coli* (PDB ID 4LZH) et YkuD de *B. subtilis* (Gram-positif) (PDB ID 1Y7M) (Toth, Stewart, *et al.* 2022). Ldt_{Ab} est unique par rapport à toutes les autres Ldts caractérisées, car c'est la seule enzyme qui possède deux domaines de liaison au PG distincts (Toth, Stewart, *et al.* 2022) (Fig. 23.B). Enfin, notons que la structure des Ldts ne permet de pas prédire leur fonction de couplage des peptides-tiges ou leur fonction d'attachement de Lpp au PG. Chez les protéobactéries, comme *E. coli*, YbiS (LdtB) est l'enzyme principalement impliquée dans le couplage de Lpp au PG (Magnet *et al.* 2008). La structure d'YbiS chez *K. pneumoniae* (Entérobactérie) montre la présence de trois domaines, un domaine LysM N-terminal, le domaine catalytique YkuD conservé et un domaine C-terminal de fonction inconnue (Lecoq *et al.* 2013). Un homologue de la LdtB (YbiS) impliquée dans le couplage de Lpp au PG est présente chez toutes les entérobactéries, mais pas chez *A. baumannii* (Toth, Stewart, *et al.* 2022) (Fig. 23.B), bien qu'*A. baumannii* possède un homologue de *lpp* (Asmar et Collet 2018). Ldt_{Ab} est ainsi l'unique Ldt présente chez *A. baumannii* qui possède une structure inhabituelle. Cette enzyme, impliquée dans la réticulation du PG est faiblement inhibée par les carbapénèmes. La superposition de quelques structures Ldts connues (*K. pneumoniae* YbiS (PDB ID 4LZH), *B. subtilis* YkuD (PDB ID 1Y7M), *E. coli* YcbB (PDB ID 6NTW), *C. rodentium* YcbB (PDB ID 7KGM)) au domaine catalytique de Ldt_{Ab} a montré que les neuf brins β comprenant les deux feuilletts β du site catalytique canonique YkuD de Ldt sont très conservés dans l'enzyme d'*A. baumannii*. De façon plutôt surprenante, le domaine catalytique de Ldt_{Ab} est structurellement le plus similaire (rmsd de 1,4 Å) au domaine catalytique YkuD de *Bacillus subtilis*, qu'aux domaines équivalents des Ldts des protéobactéries (rmsd allant de 1,6 Å à 2,8 Å) (Toth, Stewart, *et al.* 2022). De même, on ne sait pas quels résidus du site actifs sont responsables d'une des action de transpeptidation du peptide-tige ou de la Lpp. Dans les enzymes homologues à YcbB qui participent à la réticulation du PG, un résidu tyrosine conservé en position 350 (dans la numérotation des Ldt_{Ab}, Tyr507 chez YcbB d'*E. coli*) a été suggéré comme étant impliqué dans la protonation du groupe amine partant lors de la formation de l'intermédiaire acyl-enzyme par liaison thioester (Caveney *et al.* 2019; Clancy *et al.* 2010). L'enzyme d'*A. baumannii* possède un résidu glycine à cette position ; cependant, un autre résidu tyrosine (Tyr311), situé sur le brin β 8 du côté opposé de la poche du site actif, pourrait contribuer au mécanisme catalytique d'une manière similaire à la tyrosine. Ainsi, les analyses structurales des domaines catalytiques des Ldts sont importantes pour le développement de molécules inhibitrices, et la découverte de sites allostériques ouvre la voie à de nouvelles approches afin de développer de nouveaux inhibiteurs synthétiques des Ldts.

IV) L'attachement non covalent chez les bactéries à Gram-positif et les bactéries à Gram-négatif

1) Les domaines d'attachement non covalent au PG (PG-binding domains, PGBD)

En raison de son omniprésence chez les bactéries et son rôle dans l'intégrité de leur enveloppe, le peptidoglycane constitue une matrice de choix permettant la fixation de nombreuses protéines et des complexes multiprotéiques à la paroi bactérienne. Le plus souvent, les protéines sont fixées au PG de

manière non covalente grâce à des domaines spécialisés, appelés « PG-binding domains » (PGBD) ou parfois, « cell wall binding domains » (CWBD ou CBD). Plusieurs types de PGBDs sont décrits dans la littérature ; on peut citer les domaines AMIN, LysM, SPOR ou encore, OmpA-like. Par ailleurs, le PG, ou plus exactement, les fragments du PG, constituent une signature spécifique aux bactéries, appelée des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs). Ainsi, les domaines PGBDs sont également présents dans les récepteurs des cellules eucaryotes, puisqu'elles permettent la détection spécifique du PG ou de chitine, homopolymère de GlcNac chez les champignons. De cette manière, les domaines PGBD (particulièrement le domaine LysM) permettent de détecter le début d'une potentielle invasion bactérienne ou fongique au sein d'une cellule eucaryote (Mesnage *et al.* 2014). Les domaines PGBD sont composés d'un nombre variable de résidus et sont souvent associés à des zones particulières du PG. A titre d'exemple, les domaines SPOR se fixent exclusivement au PG dépourvu de peptides-tiges dit « dénudé » retrouvé au septum. Comme le PG n'est localisé que dans le périplasma, les protéines ayant un PGBD sont soit solubles dans le périplasma, soit périplasmiques mais attachées à une des membranes. Par exemple, comme cela a été mentionné dans les chapitres précédents, certaines protéines de remodelage ou de synthèse du PG, comme les PBPs, les Ldts ou encore les amidases possèdent souvent un domaine PGBD, permettant une action coordonnée et plus efficace de ces enzymes sur le PG.

[Le domaine LysM \(IPR000644, PF01476\)](#)

Le domaine LysM (Lysine Motif) présent dans plus de 11 000 protéines issues de procaryotes et d'eucaryotes (Pfam ID PF01476). Le domaine a été identifié pour la première fois chez des enzymes responsables de la dégradation de la paroi bactérienne : le lysozyme du phage ϕ 29 de *B. subtilis*, et la muramidase-2 de *S. faecalis* (Garvey *et al.* 1986; Joris *et al.* 1992). Le domaine_LysM est un petit motif globulaire dont la longueur varie entre 44 à 65 acides-aminés (Buist *et al.* 2008). Il adopte une structure très conservée, composée de deux feuillets- β antiparallèles séparées par une paire de courtes hélices α , le repliement $\beta\alpha\beta$ (Bateman *et* Bycroft 2000). Le motif LysM reconnaît les résidus GlcNac, et permet aux protéines de s'attacher à des polysaccharides comme le PG bactérien ou la chitine. Chez les bactéries à Gram-positif, le domaine LysM est responsable de la localisation d'hydrolases au PG septal. Le mécanisme sous-jacent implique la reconnaissance du GlcNac présent dans les acides téichoïques attachés par le domaine LysM (Trudelle *et al.* 2022; Yamamoto *et al.* 2008).

Le domaine LysM est retrouvé chez des enzymes responsables de la modification ou de la synthèse du PG, comme la transglycosylase lytique MltD d'*E. coli* (Mesnage *et al.* 2014), l'endopeptidase NlpC/P60 de *Thermus thermophilus* (Wong *et al.* 2015), chez NlpD, l'activateur de l'amidase AmiC chez *E. coli*, ou encore l'amidase XlyA de *Bacillus subtilis* (Andre *et al.* 2008). De plus, quelques Ldts responsables de la réticulation du PG possèdent un domaine LysM : Ldt_{Bs} de *B. subtilis* (Magnet *et al.* 2007), Ldt_{Ab} d'*A. baumannii* (Ahmad *et al.* 2022) et la LdtE (YnhG) d'*E. coli* ; il en va de même pour la LdtC (YcfS), responsable du couplage de Lpp au PG chez *E. coli*.

Par ailleurs, le domaine LysM est retrouvé chez les eucaryotes, où il sert de signal dans la reconnaissance plante-pathogène par le système immunitaire des plantes (Gimenez-Ibanez *et al.*

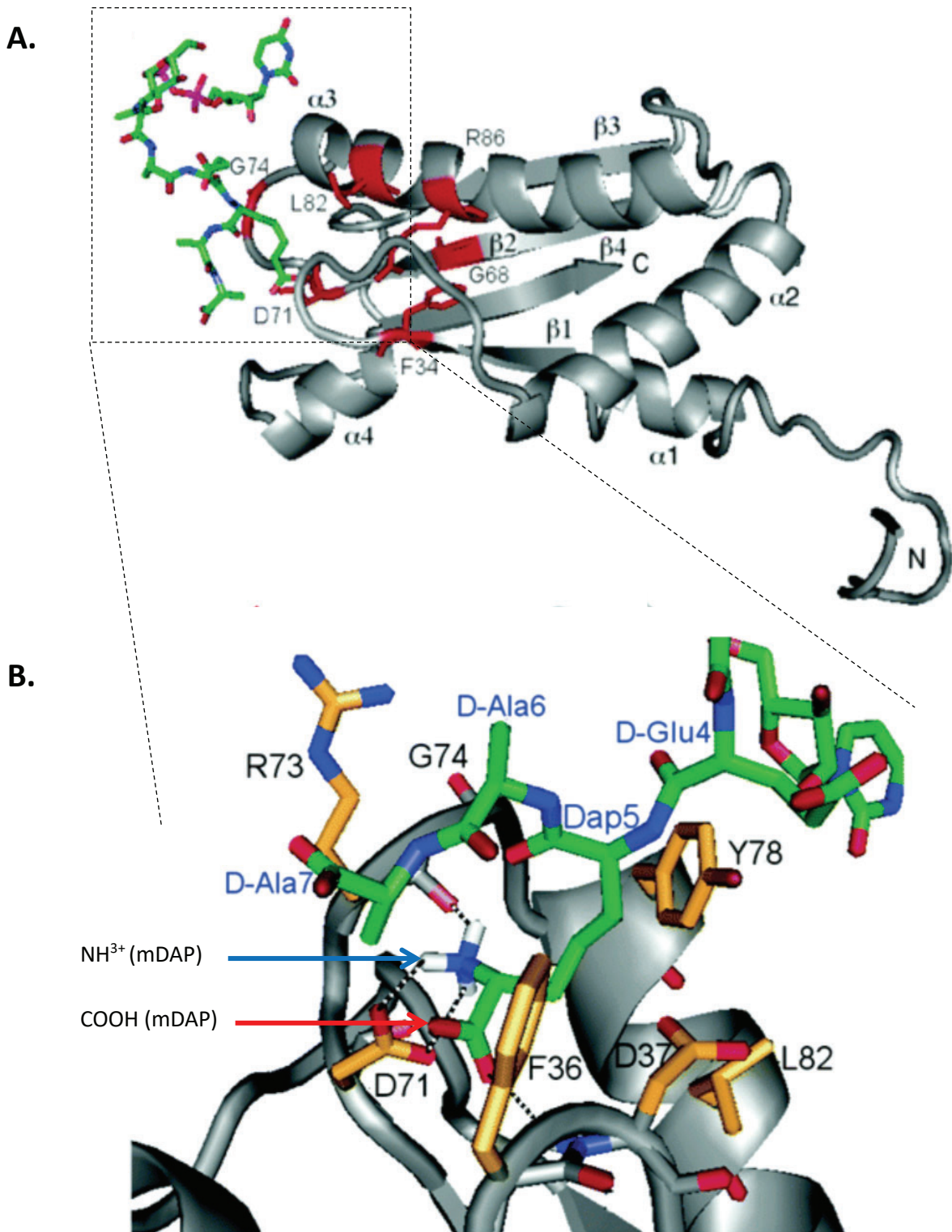


Figure 24. Structure du complexe Pal avec le précurseur de PG, le lipide I. **A.** La lipoprotéine Pal est représentée sous forme de ruban gris, les résidus conservés sont en rouge. Le peptide-tige est représenté en vert. **B.** Vue détaillée de l'interaction non-covalente entre Pal et le peptide-tige. Les atomes de carbone des résidus Pal formant des liaisons H avec les résidus du peptide-tige sont représentés par des bâtonnets orange avec des étiquettes noires. Les résidus du peptide-tige sont en vert avec des étiquettes bleues. La chaîne principale de Pal est représentée par un ruban gris. Les liaisons H entre m-Dap⁵ et Pal sont représentées par des lignes pointillées. Les atomes d'oxygène sont en rouge, les atomes d'azote en bleu et les atomes d'hydrogène du groupe ϵ -ammonium de m-Dap⁵ sont en blanc. D'après Parsons *et al.* 2006.

2009). A titre d'exemple, on peut citer le Nod Factor (NFP), récepteur de plante qui est nécessaire à la formation de la symbiose rhizobienne chez les légumineuses (Arrighi *et al.* 2006).

Le domaine SPOR (Sporulation-related repeat)

Les domaines SPOR (sporulation related repeat) sont composés de 70 acides aminés, dont la séquence est faiblement conservée < 20 % (Alcorlo *et al.* 2019). A l'origine, ce domaine a été identifié chez des protéines impliquées dans la sporulation bactérienne chez *B. subtilis* (Kuroda *et al.* 1993). Le domaine SPOR reconnaît spécifiquement le PG « dénudé », dépourvu de peptide-tige (Yahashiri *et al.* 2017). Ce type de PG est retrouvé au septum, où l'absence de peptides-tige permet la libération des cellules-filles lors de la division cellulaire (Priyadarshini *et al.* 2006). Le PG dénudé est généré par l'action d'amidasés recrutés au septum qui clivent le peptide-tige au niveau du groupe lactyle du MurNaC (Fig. 19).

De nombreuses protéines possédant un domaine SPOR sont impliquées dans le remodelage du saccule et permettent la coordination avec l'avancement de la division cellulaire (Yahashiri 2015). Par exemple, le recrutement de FtsN au septum coïncide avec la constriction du PG septal. Il a été montré que FtsN initiait la synthèse du PG septal par le complexe FtsWI pendant la division cellulaire bactérienne (Addinall *et al.* 1997; Gerding *et al.* 2007; Lyu *et al.* 2022).

Cependant, toutes les protéines possédant un domaine SPOR ne sont pas impliquées dans le remodelage du saccule. C'est par exemple le cas de la protéine TssL du système de sécrétion de type VI (T6SS) de *Marinomonas* et de *Vibrio harveyi* (Aschtgen *et al.* 2010). Entre autres, la sécrétine LspD du système de sécrétion de type II (T2SS) de *L. pneumophila* possède un domaine SPOR N-terminal (Ghosal *et al.* 2019). Ghosal et ses collaborateurs ont observé que le T2SS de *L. pneumophila* était uniquement présent au niveau du septum, sans toutefois avoir établi un lien entre sa localisation de LspD et la présence du domaine SPOR.

Le domaine AMIN

Le domaine AMIN est également impliqué dans la reconnaissance du PG septal. Ce domaine a été décrit pour la première fois en 2008, lors l'étude de la structure de l'amidase AmiC (Rocaboy *et al.* 2013; de Souza *et al.* 2008). AmiC possède un domaine AMIN en N-terminal ; c'est une protéine localisée au septum, jouant rôle-clé dans la division des cellules naissantes (Bernhardt et De Boer 2003). Ce domaine est également retrouvé chez AmiB, une autre amidase (de Souza *et al.* 2008), et il est responsable de la localisation de la sécrétine du pilus de type IV (T4P) de *P. aeruginosa* (Carter *et al.* 2017).

Le domaine OmpA-like

Le domaine OmpA-like est retrouvé dans de nombreuses protéines chez les bactéries à Gram-négatif. Elles sont impliquées dans le maintien de l'intégrité de l'enveloppe bactérienne dont la porine OmpA elle-même, la lipoprotéine Pal (Parsons *et al.* 2006; Samsudin *et al.* 2016). Elles sont retrouvées

dans des systèmes de motilité, comme le composant du stator du système flagellaire, MotB, mais également chez les protéines en tonneau- β P5 et P6 de *H. influenzae* (Chang *et al.* 2011; Mot *et Vanderleyden* 1994), et chez les protéines TssL, SciZ (TagL), TagP du système de sécrétion de type VI (T6SS) d'*E. coli* (Aschtgen, Gavioli, *et al.* 2010; Aschtgen, Thomas, *et al.* 2010). Il faut noter que la protéine SciZ n'est pas présente dans tous les T6SS (Santin *et Cascales* 2017).

Le domaine OmpA-like possède un repliement $\beta/\alpha/\beta/\alpha-\beta(2)$. Parsons et ses collaborateurs ont déterminé par spectroscopie RMN la structure tridimensionnelle d'un complexe entre le domaine périplasmique de Pal et un précurseur du PG apparenté au lipide I (UDP-N-acétylmuramyl-pentapeptide-tige) (Fig. 24). Ils ont montré que Pal possédait une poche de liaison bordée de résidus de surface conservés qui interagit exclusivement avec le peptide-tige du précurseur de PG. En effet, le résidu m-Dap, est séquestré dans cette poche et joue un rôle important en formant des liaisons hydrogène et des contacts hydrophobes avec Pal. Or, les études structurales des domaines OmpA-like de MotB de *H. pylori*, et d'OmpA d'*A. baumannii*, suggèrent que les sites présumés d'interaction avec le PG sont variés (Park *et al.* 2012; Roujeinikova 2008).

2) Systèmes d'attachement de la ME par des protéines possédant des domaines de liaison non covalent au PG chez les bactéries à Gram-négatif

La ME ne flotte pas librement autour de la cellule. Elle est arrimée au PG par des protéines et des systèmes d'attachement spécialisés. Ceux-ci sont situés dans la ME (lipoprotéines Lpp et Pal et OMPs, comme OmpA et OmpM), ou dans la MI (système Tol-Pal) (Asmar et Collet 2018; Park *et al.* 2012; Szczepaniak *et al.* 2020) Ils interagissent majoritairement avec le PG de façon non covalente, par des domaines de liaison au PG (OmpA, Pal) ou par une liaison covalente entre un acide aminé de la protéine et le peptide-tige (Lpp). Ces systèmes permettent non seulement de positionner correctement la ME, mais également d'assurer l'intégrité de l'enveloppe bactérienne tout au long du cycle cellulaire. Par exemple, la lipoprotéine Pal recrutée au septum stabilise la ME lors de la constriction de celle-ci durant la division cellulaire (Szczepaniak *et al.* 2020). Une simulation informatique a même suggéré que la protéine de la MI, TolR, pouvait maintenir attachée la couche de PG à la MI via des interactions électrostatiques en collaboration avec la protéine OmpA (Boags *et al.* 2019). L'attachement de la ME à la couche de PG peut se faire de manière covalente par un attachement enzymatique des protéines au peptides-tiges du PG (le cas de Lpp) ou de manière non covalente par des domaines protéiques spécialisés de liaison au PG (PG-binding domains) via des liaisons faibles ou des ponts salins. Les systèmes d'attachement de la ME au PG et sont indispensables car leur absence (délétion de *lpp*, *ompA*, ou *pal*) déclenche la vésiculation de la membrane et formation de bosses appelés « blebs ». Ceci a pour conséquence la fuite du matériel périplasmique à l'extérieur de la cellule. Je présente ci-après plus en détail les protéines Lpp et OmpA ainsi que le système Tol-Pal. Ces systèmes sont bien étudiés chez les γ -protéobactéries, surtout chez *E. coli*. Or, Lpp n'est présente que chez les γ -protéobactéries, tandis que OmpA et Pal, chez toutes les Gracilicutes. Chez les Terrabactéries didermes, c'est la porine OmpM qui joue le rôle d'attache de la ME au PG (Witwinowski *et al.* 2022).

OmpA

La protéine OmpA est présente en 3×10^5 copies par cellules (Koebnik *et al.* 2000). La partie N-terminale d'OmpA est un tonneau- β inséré dans la ME, relié par un linker périplasmique à un domaine globulaire C-terminal appelé domaine « OmpA-like » capable de se lier de façon non covalente au PG (Samsudin *et al.* 2016) (Fig. 6). A la différence de la lipoprotéine Lpp qui constitue un ressort trimérique, la partie linker d'OmpA fournirait un soutien mécanique flexible entre la ME et le PG (Samsudin *et al.* 2016) (Fig. 6 et 8). Cascales et ses collègues ont montré par une approche de photo-crosslinking que les protéines Pal, OmpA et Lpp interagissaient entre elles *in vivo* (Cascales *et al.* 2002).

Les travaux de Samsudin et ses collègues suggèrent que l'attachement covalent de Lpp au PG attirerait localement la couche de PG vers la ME, ce qui faciliterait l'interaction d'OmpA au PG (Samsudin *et al.* 2016).

Tol-Pal

Le système Tol-Pal est un système constitué de 5 protéines TolABQR et Pal dont les gènes sont organisés en opéron (Cascales *et al.* 2002) (Fig. 6). Les gènes *tol* ont été identifiés dans les années 60 après que plusieurs équipes de recherche ont identifié des souches mutantes d'*E. coli* tolérantes aux bactériophages, ainsi qu'aux colicines, antibiotiques formant des canaux ioniques dans la membrane cytoplasmique (Braun *et al.* 1994; De Zwaig *et Luria* 1967). TolA, TolQ, TolR forment un complexe transmembranaire et possèdent également des domaines périplasmiques. La protéine TolB quant à elle est périplasmique. TolB interagit avec TolA et forme un complexe avec la lipoprotéine Pal. Le système Tol-Pal est hautement conservé chez les bactéries à Gram-négatif (Gracilicutes). Il traverse l'enveloppe entière et est impliqué dans le maintien de son intégrité à la fois durant la division (Yakhnina *et Bernhardt* 2020), mais également durant l'élongation de la cellule (Park *et Cho* 2022). Pour ces raisons, le mutant *tol-pal* présente des phénotypes pléiotropes : vésiculation de la ME (Lazzaroni *et Portalier* 1981), et un défaut d'invagination de la ME lors de la mise en place du septum (Weigand *et Rothfield* 1976). Les effets de la mutation *tol-pal* sont également visibles à échelle macroscopique : chez *E. coli*, les colonies deviennent muqueuses lors d'une incubation à 30°C, et la mutation est létale à 42°C (Bernstein *et al.* 1972; Nomura *et Witten* 1967). Au niveau microscopique, les cellules d'*E. coli* mutées filamentent dans un milieu liquide hypoosmotique (Gerding *et al.* 2007). Les cellules présentent une sensibilité accrue aux agents détergents comme les sels biliaires ou le SDS, ainsi qu'aux antibiotiques β -lactames et la vancomycine (Bernstein *et al.* 1972; Davies *et Reeves* 1975; De Zwaig *et Luria* 1967). Au niveau moléculaire, la mutation *tol-pal* perturbe le ratio phospholipide/LPS de la ME, et par conséquent impacte sa fluidité (Masilamani *et al.* 2018). De plus, la surproduction de Pal guérit le phénotype du mutant *lpp*, mais la surproduction de Lpp ne guérit pas complètement le phénotype du mutant *pal* chez *E. coli* (Cascales *et al.* 2002).

Systèmes alternatifs d'attachement de la ME au PG

Chez les β -protéobactéries et les Burkholderiales, l'intégrité de l'enveloppe cellulaire est assurée par l'interaction entre la porine OmpC et la protéine associée au PG PapA possédant un domaine

OmpA-like (Wang *et al.* 2021). La même équipe a montré que les mutants *papA* de *Comamonas testosteroni* perdaient leur capacité de chimiotaxie et que leur ME était dissociée du PG.

V) L'attachement covalent des protéines chez les bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif

1) L'attachement covalent des protéines par les sortases chez les bactéries à Gram-positif

Chez les bactéries didermes, les protéines de la surface sont assemblées et attachées à la membrane externe. Les bactéries monodermes utilisent principalement leur paroi cellulaire pour ancrer et exposer des protéines et des organelles adhésives à la surface de la cellule. Chez ces bactéries, une partie des protéines de la surface est attachée au peptidoglycane ou aux autres polymères de la paroi de manière non covalente grâce aux domaines et motifs spécialisés, comme LysM ou GW qui se lie aux acides lipotéichoïques (Buist *et al.* 2008). Or, la grande majorité des protéines de la surface chez les bactéries monodermes est couplée au PG de manière covalente par une classe particulière de transpeptidase appelées sortases. Ainsi, les sortases sont indispensables dans la mise en place de diverses structures impliquées dans l'acquisition de nutriments ou encore, dans les interactions avec l'hôte, y compris dans les processus infectieux. Par exemple, les protéines de surface comme l'internaline A de *Listeria monocytogenes* et la protéine A (SpA) de *Staphylococcus aureus* jouent un rôle prépondérant dans l'invasion de leurs hôtes (Bierne *et al.* 2002). SpA est une des protéines modèles pour l'étude de l'adressage des protéines à la paroi bactérienne (Schneewind *et al.* 1992). C'est un facteur de virulence ubiquitaire qui joue un rôle prépondérant dans l'invasion de son hôte. En effet, elle interfère avec l'accrochage des anticorps et des protéines du complément à la surface bactérienne, ce qui empêche l'élimination des staphylocoques par phagocytose (Boero *et al.* 2022). Ainsi, la délétion de gènes de sortases diminue ou abolit les phénomènes d'adhésion et d'internalisation de la bactérie (Bierne *et al.* 2002). Pour cette raison, les sortases sont souvent considérées comme des facteurs de pathogénie.

Les sortases reconnaissent la séquence Cell Wall Sorting Signal (CWS) contenant un motif LPxTG (où x est n'importe quel acide-aminé), suivi d'une séquence transmembranaire hydrophobe et d'une courte séquence cytoplasmique chargée positivement (Boekhorst *et al.* 2005). Le domaine hydrophobe et les résidus chargés positivement empêcheraient la sécrétion de la protéine en la retenant dans la membrane, tandis que le motif LPxTG est indispensable au couplage covalent de la protéine au PG lors l'attaque nucléophile réalisée par la sortase (Marraffini *et Schneewind* 2007). Les sortases, possèdent une cystéine catalytique qui effectuent une addition nucléophile sur la thréonine du motif LPxTG, ce qui a pour effet de cliver le motif entre la thréonine (T) et la glycine (G), et de libérer la protéine de son ancre transmembranaire, dans le périplasme (Boekhorst *et al.* 2005; Hendrickx *et al.* 2011). La protéine est ensuite transférée au pont pentaglycine attaché au 3^e résidu L-Lys³ du lipide II (Hendrickx *et al.* 2011). Le lipide II ainsi attaché à la protéine est ensuite ajouté au PG existant grâce à l'action de glycosyltransférases.

Les gènes codant pour des sortases sont présents en multiples copies chez les bactéries à Gram-positif (Dramsi *et al.* 2008). Six classes de sortases ont été répertoriées sur la base d'homologies de séquence et de préférence de substrat : les sortases de classe A, B, C, D, E et F (Spirig *et al.* 2011). Les analyses de séquence ont révélé que toutes les sortes possèdent des résidus conservés His-Cys-Arg impliqués dans la triade catalytique (Bhat *et al.* 2021). Toutefois, à l'intérieur d'un même groupe de sortases issues d'espèces différentes, on retrouve un faible pourcentage d'identité de séquence. Cela pourrait s'expliquer par le fait que ces sortes ont évolué avec le PG de leurs bactéries respectives. Cela est d'autant plus vrai que les bactéries à Gram-positif possèdent une plus grande variabilité de résidus en position 3 du peptide-tige que les bactéries à Gram-négatif (Vollmer, Blanot, *et al.* 2008).

Les sortases de classe A sont des enzymes 'de ménage' caractérisées par une signature TLXTC (où X est souvent une valine, une isoleucine ou une thréonine) (Bhat *et al.* 2021). Cette classe est constituée d'une seule enzyme SrtA chez les bactéries à Gram-positif à faible pourcentage GC, à deux exceptions près : *Enterococcus faecalis* qui possède deux copies de gène *srtA* et *Streptococcus thermophilus* qui ne possède pas de gène *srtA* fonctionnel. Par ailleurs, SrtA de *S. aureus*, la sortase la mieux caractérisée, est responsable du couplage de SpA au PG de *S. aureus* (Ramirez *et al.* 2020). Le gène *srtA* est constitutivement exprimé et ne présente généralement pas de synténie avec ses substrats. SrtA est une enzyme à faible spécificité enzymatique capable d'ancrer la majorité des protéines contenant un motif LPXTG. De plus, Kruger et ses collègues ont montré que SrtA était capable de prendre en charge des variants non canoniques de motifs LPxTG, tels que ceux présents dans les protéines SasD (LPAAG) et SasF (LPKAG) (Kruger *et al.* 2004).

Le site catalytique des sortases de classe B présente un motif TLXTC où X est préférentiellement une sérine. L'unique substrat de SrtB de *S. aureus* ne possède pas un motif LPxTG, mais reconnaît le motif NPQTN retrouvé chez la protéine IsdC capturant l'hème de leur hôte (Mazmanian *et al.* 2002). Chez *S. pyogenes*, SrtB prend exclusivement en charge la protéine T6 qui possède un motif LPxTG, malgré la présence de SrtA (Barnett *et Scott* 2002).

Les sortases de classe C, comme SrtC1 et SrtC2 d'*Actinomyces oris*, sont désignées de 'pilus-specific', car elles sont exclusivement responsables de l'assemblage et de la polymérisation des fimbriae et des pili grâce à leur activité de polymérisation de protéines (Ramirez *et al.* 2020). Par ailleurs, les gènes *fimA*, *fimB* et *srtC2* sont organisés en opéron. Une fois assemblés par SrtC, les pilines sont additionnés au PG par la sortase SrtA (Ramirez *et al.* 2020).

Les sortases de classe D reconnaissent un site LPNTA (Spirig *et al.* 2011). Chez *B. anthracis*, Ba-SrtC est permet l'attachement de BasH au PG et BasI à la paroi de la spore, des protéines qui facilitent la sporulation de la bactérie (Marraffini *et Schneewind* 2007). La délétion de Ba-SrtC est d'une part responsable de la pathogénicité de *B. anthracis* chez la souris, et d'autre part réduit l'efficacité de la formation de la spore lorsque la concentration en oxygène est limitante (Marraffini *et Schneewind* 2006).

Les sortases de classe E sont des enzymes de 'ménage' tout comme les sortases de classe A, et reconnaissent un motif LAXTG (Swaminathan *et al.* 2007). Elles sont présentes dans certaines bactéries riches en G/C. Une seule sortase de classe E est pour l'instant caractérisée : la Cd-SrtF de *C. diphtheriae* (Swaminathan *et al.* 2007).

La sortase de classe F la mieux caractérisée est la Sortase F de *Propionibacterium acnes*, qui est d'ailleurs la seule sortase de ce microorganisme (Di Girolamo *et al.* 2019). Les sortases de classe F possèdent la même activité que les sortases de classe A de *S. aureus* car elles reconnaissent le motif LPxTG. Toutefois, contrairement aux sortases de classe A, leur activité est indépendante des cations divalents (Di Girolamo *et al.* 2019).

Comme mentionné précédemment, chez les bactéries à Gram-négatif, l'attachement covalent de protéines au PG est effectué par les L,D-transpeptidases, Ldts. Bien que les exemples de protéines attachées covalamment au PG soient rares chez ces bactéries, les études récentes ont montré qu'elles ne se limitaient plus à la seule lipoprotéine Lpp. En effet, les protéines attachées de manière covalente au PG connues à ce jour sont situées dans la ME et comprennent des lipoprotéines, comme Lpp et LimB de *Coxiella burnetii*, ainsi que des protéines en tonneau- β , retrouvées chez certaines α et γ -protéobactéries (Omp2b, Omp31, OmpW, OmpP, BbpA et BbpP) (Godessart *et al.* 2021; Magnet *et al.* 2007; Sandoz *et al.* 2021). Les porines mentionnées ci-dessus ont le rôle semblable à celui de Lpp : elles assurent l'ancrage de la ME à la couche de PG et jouent un rôle essentiel pour maintenir l'intégrité de l'enveloppe bactérienne, car leur élimination provoque la déstabilisation de l'enveloppe (Godessart *et al.* 2021; Sandoz *et al.* 2021).

2) L'attachement covalent des protéines par les L,D-transpeptidases chez les bactéries à Gram-négatif

Chez les Protéobactéries, la lipoprotéine Lpp est la seule protéine connue qui est attachée au PG par une liaison covalente (Fig. 6, Fig. 8 et Fig. 20.C). Présente à près d'un million d'exemplaires, Lpp est la protéine la plus abondante chez *E. coli*. C'est une petite lipoprotéine de 58 acides aminés ancrée à la ME via sa partie N-terminale : les trois chaînes d'acides gras sont couplées via la cystéine N-terminale de Lpp. La partie C-terminale de la protéine quant à elle est couplée au PG via la lysine C-terminale. Ainsi Lpp constitue une sorte de ressort qui rattache la couche de PG à la ME. 1/3 du pool de Lpp est attachée de manière covalente, tandis que 2/3 interagirait de manière non covalente au PG (Cowles *et al.* 2011). La délétion de *lpp* a des effets pléiotropes sur la cellule : vésiculation de la ME, filamentation des cellules, sensibilité accrue aux composés chimiques comme les antibiotiques (Mathélié-Guinlet *et al.* 2020) (Fig. 8).

a. L'attachement de la lipoprotéine de Braun (Lpp) au PG

Lpp a été découverte par Volkmar Braun en 1969, alors que celui-ci travaillait sur la succinate déshydrogénase d'*E. coli*, à l'institut Max Planck en Allemagne (Braun 2018). Au cours de ses expériences visant à libérer la succinate déshydrogénase de la MI par clivage protéolytique, Braun a remarqué une forte diminution de la densité optique des enveloppes cellulaires traitées à la trypsine (Braun et Rehn 1969). L'examen de ces enveloppes par microscopie électronique a révélé que la ME se dissociait de la MI (Braun et Rehn 1969). Ces observations ont suggéré qu'une liaison sensible à la

trypsine jouait un rôle crucial pour l'organisation structurale et la stabilité de l'enveloppe. En digérant le PG par le lysozyme, Braun a pu estimer qu'environ un disaccharide sur dix était attaché à Lpp via le peptide-tige (Braun *et Rehn* 1969). Cela suggère que la distribution spatiale de Lpp se produit environ tous les 100 Å le long de la chaîne de glycanes. Ainsi, Lpp fournit une attache covalente répartie de manière homogène le long du PG, assurant ainsi la stabilité de la ME.

Au moment de sa découverte, Lpp a défini deux nouvelles classes de protéines : i) les protéines couplées de manière covalente au PG ; et ii) les lipoprotéines, car Lpp était la première protéine caractérisée portant une modification lipidique en N-terminal et permettant l'ancrage à la membrane (Braun *et Rehn* 1969). *E. coli* exprime environ 100 lipoprotéines différentes, ancrées soit à la MI, soit à la ME (Szewczyk *et Collet* 2016). Ces protéines sont impliquées dans divers processus cellulaires, tels que la biogenèse de l'enveloppe, la transduction des signaux, la détection du stress, la virulence, ou encore la division cellulaire (Szewczyk *et Collet* 2016). Parmi celles-ci, Lpp demeure la lipoprotéine la plus abondante chez *E. coli* (~10⁶ copies par cellules) (Li *et al.* 2014). Le niveau d'expression impressionnant de Lpp peut être expliqué par trois facteurs principalement liés à son ARNm. Premièrement, dans des conditions standard de laboratoire, l'ARNm de Lpp représente jusqu'à 10% de tous les ARNm cellulaires (Li *et al.* 2014). Deuxièmement, cet ARNm a une demi-vie de 12 minutes (Hirashima *et al.* 1973). Cela rend l'ARNm de Lpp extraordinairement stable puisque la demi-vie moyenne des ARNm d'*E. coli* est de 1,3 minutes (Carlson *et Ingraham* 1983). Enfin, la région promotrice du gène *lpp* contient une teneur élevée en nucléotides AT, qui faciliterait le déroulement des brins par l'ARN polymérase pour l'initiation de la transcription. Cette dernière caractéristique est retrouvée chez *E. coli*, *Serratia marcescens* et *Erwinia amylovora* (Yamagata *et al.* 1981).

Lpp reste jusqu'à présent l'unique lipoprotéine connue pour être couplée de manière covalente au PG chez la bactérie modèle *E. coli* (Asmar *et Collet* 2018; Braun *et Rehn* 1969). Chez cette même bactérie, Lpp est codée par un unique gène *lpp* synténique avec le gène *ynhG* codant pour la L,D-transpeptidase LdtE (YnhG). En revanche, chez *Salmonella* deux gènes *lppA* et *lppB* sont situés en tandem, et seule *lppA* est exprimée en conditions de laboratoire (Kröger *et al.* 2013; Sha *et al.* 2004). Ainsi, Lpp joue un rôle primordial dans le maintien de l'intégrité de l'enveloppe bactérienne en procurant l'unique attachement covalent de la ME à la couche de PG. L'analyse des propriétés de l'enveloppe du mutant *lpp* d'*E. coli* par AFM a révélé que la perte de Lpp, ou la perte de son couplage covalent au PG, diminuait la rigidité de l'enveloppe. En effet, la valeur du module de Young est de 3 MPa pour la souche sauvage, tandis qu'elle est de 1 MPa en moyenne pour le mutant *lpp* (Mathélié-Guinlet *et al.* 2020). Par ailleurs, l'allongement de Lpp de 21 résidus augmente la perméabilité de la ME à la vancomycine, ainsi que le volume de la cellule d'*E. coli*, démontrant son importance dans la structure de l'enveloppe (Mathélié-Guinlet *et al.* 2020). Chez *E. coli*, la délétion du gène *lpp* entraîne la vésiculation de la ME et la fuite de matériel périplasmique (Asmar *et Collet* 2018; Mathélié-Guinlet *et al.* 2020). Les trois systèmes d'attachement à la ME sont partiellement redondants : les lipoprotéines Lpp et Pal, et la porine OmpA. Bien que Pal et OmpA se lient de manière non covalente au PG, la surexpression de ces deux protéines supprime certains défauts du mutant *lpp* (Cascales *et al.* 2002; Park *et al.* 2012; Parsons *et al.* 2006; Samsudin *et al.* 2017). De plus, ces systèmes sont complémentaires dans le processus de division cellulaire chez *E. coli*, puisque la délétion simultanée de *lpp* et de *pal* entraîne la filamentation de la bactérie (Sheng *et al.* 2023) Par ailleurs, Lpp est

responsable du maintien de la taille du périplasme, plus exactement de la distance entre la ME et le PG (Cohen *et al.* 2017; Mandela *et al.* 2022).

Structure de Lpp

La lipoprotéine de Braun (Lpp) est une petite protéine de 58 acides aminés dont la structure primaire est composée d'une hélice α (Fig. 8.D). Lpp possède trois régions : une glycérilcystéine N-terminale ancrée à la ME par trois chaînes d'acides gras (Shu *et al.* 2000) une hélice α composée des résidus 5 à 53, et une région C-terminale terminée par une lysine, impliquée dans l'attachement covalent de Lpp au PG (Braun *et Rehn* 1969) (Fig. 8.A, 8.B et 8.D).

Malgré son rôle important dans la stabilisation de l'enveloppe bactérienne, Lpp a uniquement été identifiée chez les γ -protéobactéries, dont les Enterobacteriaceae, Vibrionaceae, Shewanellaceae et Pseudomonadaceae, ainsi que chez la δ -protéobactérie *Geobacter* (Asmar *et Collet* 2018; Mandela *et al.* 2022; Witwinowski *et al.* 2022). La taille de Lpp est bien conservée chez la plupart des espèces, mais la Lpp la plus longue est retrouvée chez les bactéries du genre *Geobacter*, d'une longueur de 79 résidus, soit 21 résidus de plus que la Lpp d'*E. coli* (Mandela *et al.* 2022). La répétition d'acides aminés hydrophobes tous les 2 à 4 résidus permet à Lpp de s'associer à deux autres molécules de Lpp pour former une triple-hélice α coiled-coil (Shu *et al.* 2000) (Fig. 8.A 8.B). La formation de la structure quaternaire de Lpp *in vitro* est lente, mais l'association des trois hélices α est robuste, puisque sa déstabilisation nécessite de briser les multiples liaisons van der Waals et les ponts salins formés entre les résidus chargés, comme la lysine et l'aspartate (Dragan *et al.* 2004).

De manière générale, la séquence de Lpp est bien conservée chez les bactéries (Asmar *et Collet* 2018). Le plus souvent, l'extrémité C-terminale de Lpp est composée d'un motif tyrosine⁵⁶-arginine⁵⁷-lysine⁵⁸ (YRK) comme chez *E. coli*, ou d'un motif tyrosine⁵⁶-lysine⁵⁷-lysine⁵⁸ (YKK) comme chez *Dickeya* et certaines autres γ -protéobactéries (Asmar *et Collet* 2018; Shu *et al.* 2000). Il a été démontré que la partie C-terminale de la triple-hélice était fortement stabilisée par le cycle aromatique de la tyrosine⁵⁶. En effet, les trois cycles aromatiques de la triple-hélice sont quasiment perpendiculaires l'un à l'autre (80°), et s'inclinent d'environ 30° vers l'axe de l'hélice (Shu *et al.* 2000) (Fig. 8.D). La comparaison des séquences de Lpp montre que Tyr⁵⁶ est très conservée, alors que les résidus 54, 55 et 57 sont variables, suggérant que la Tyr⁵⁶ est effectivement très importante dans la structure de Lpp et/ou pour son couplage au PG (Shu *et al.* 2000). En ce sens, les études thermodynamiques ont montré que le remplacement de la Tyr⁵⁶ de Lpp par un résidu alanine a diminué la stabilité du trimère de Lpp de 1,1 kcal par mol de trimère (Shu *et al.* 2000). La Tyr⁵⁶ jouerait donc un rôle structural important dans le maintien de la triple hélice de Lpp.

Résidus importants pour le couplage de Lpp au PG

Lpp est attachée de manière covalente par le résidu de la lysine C-terminale au mDAP³ du PG. Plus précisément, le groupe ϵ -amine de la chaîne latérale de la Lys⁵⁸ est couplé de façon covalente au α -carboxyle du mDAP³ d'un peptide-tige (Magnet *et al.* 2007) (Fig. 8.B et 20.C). Nécessairement, le résidu

lysine C-terminal est très conservé parmi les homologues de la Lpp, puisqu'il est indispensable à la liaison de Lpp au PG (Zhang *et Wu* 1992:19). Par conséquent, la substitution de la lysine C-terminale abolit le couplage de Lpp au PG (Mathélié-Guinlet *et al.* 2020; Zhang *et Wu* 1992). Par ailleurs, des expériences de mutagenèse dirigée du motif YRK de la Lpp d'*E. coli* ont montré que la substitution d'acides aminés proches de la lysine C-terminale pouvait impacter l'attachement covalent de Lpp au PG (Zhang *et Wu* 1992). En effet, le remplacement de la Tyr⁵⁶ ou de l'Arg⁵⁷ par des acides aminés induisant un tour β dans l'hélice α , entraînaient la réduction de l'attachement de Lpp au PG et ce, malgré la conservation de la lysine C-terminale (Zhang *et Wu* 1992). Dans leurs expériences, Zhang *et ses collaborateurs* ont notamment remplacé la Tyr⁵⁶ par Pro, Ser, Gly ou Arg ; et ont remplacé l'Arg⁵⁷ par Leu ou des résidus Asp et Glu chargés négativement (Zhang *et Wu* 1992).

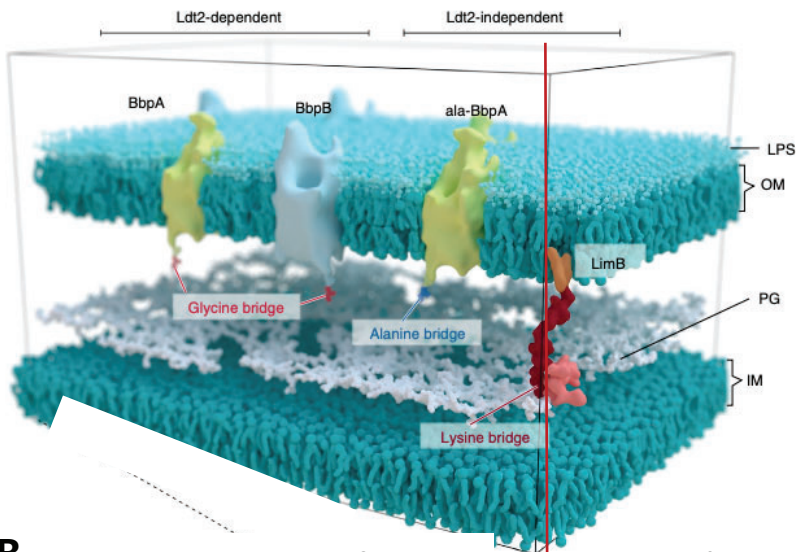
Localisation de Lpp

Il a été montré que les défauts de localisation de Lpp pouvaient être létaux pour la bactérie. En effet, la Ser² de Lpp constitue un signal d'adressage à la ME et sa substitution par une aspartate provoque l'accumulation de Lpp à la MI (Yakushi *et al.* 1997). En conséquence, cette substitution (S²D) empêche la séparation de la MI et de la ME dans le gradient de sucrose, puisque Lpp mal-localisée cause l'attachement au PG, qui reste à son tour attaché à la ME via OmpA et Pal. La mutation Lpp_S²D est létale pendant une culture prolongée de bactéries, mais elle est tolérée lorsqu'on ajoute une substitution supplémentaire de la lysine⁵⁸, car cette mutation empêche le couplage aberrant de Lpp localisée à la MI au PG. De même, le traitement des bactéries à la globomycine, un inhibiteur de la signal peptidase II (LspA) spécifique de lipoprotéines provoque une accumulation de Lpp à la MI et est létal, mais tolérée avec le variant Lpp dépourvu de la lysine C-terminale (Tanaka, Matsuyama, et Tokuda 2001; Yakushi *et al.* 1997). Très récemment, la visualisation du saccule d'*E. coli* par AFM, a permis à Sheng *et ses collaborateurs* d'observer la répartition de Lpp au niveau du PG. Leurs expériences ont révélé que Lpp était exclusivement attachée à la surface du PG faisant face à la ME (Sheng *et al.* 2023). De plus, chez des cellules d'*E. coli* qui ne sont pas en cours de division, Lpp est répartie de manière homogène sur le PG latéral, ainsi qu'aux pôles de la cellule. En revanche, la répartition de Lpp devient hétérogène lorsque la cellule entre en phase de division : Lpp est absente des pôles de la cellule, mais est toujours présente au niveau du PG latéral (Sheng *et al.* 2023). Comme Pal est recrutée au site de division (Gerding *et al.* 2007), il est possible que Pal empêche l'interaction covalente de Lpp avec le PG (Sheng *et al.* 2023). Ces observations illustrent le phénomène de coordination de la répartition de Lpp durant la division cellulaire. L'absence de Lpp au septum permet très probablement la séparation correcte de l'enveloppe des cellules filles.

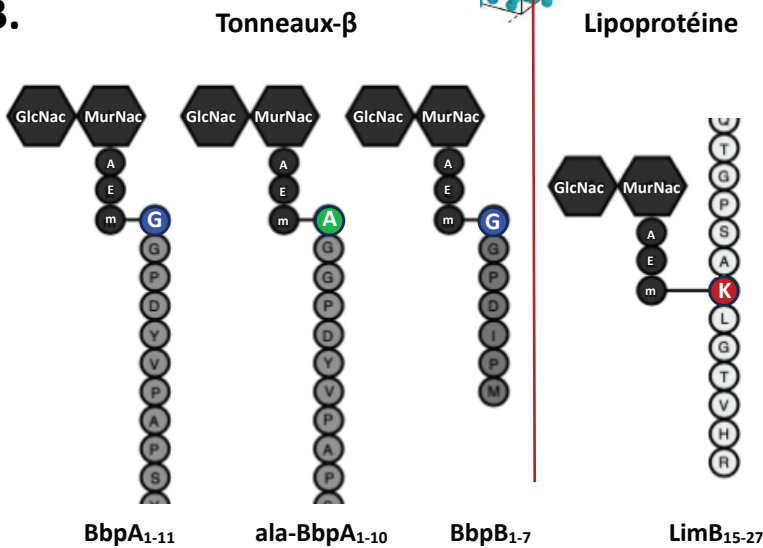
Rôles de Lpp : maintien de l'intégrité de l'enveloppe et de la taille du périplasme

Le mutant *lpp* d'*E. coli* est viable et ne présente pas de défauts de croissance majeurs en conditions de laboratoire. Les cellules présentent néanmoins de nombreux phénotypes, notamment une sensibilité aux antibiotiques hydrophobes comme la vancomycine ; aux agents chélateurs comme l'EDTA ; aux détergents comme le SDS et le désoxycholate (Cascales *et al.* 2002; Hirota *et al.* 1977;

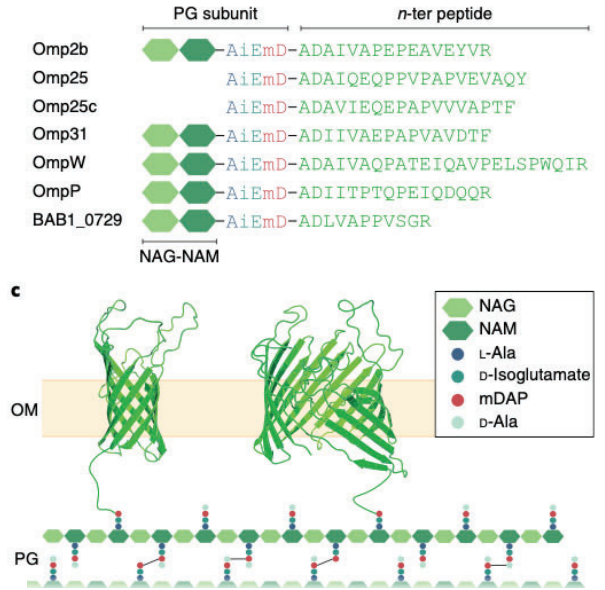
A.



B.



C.



D.

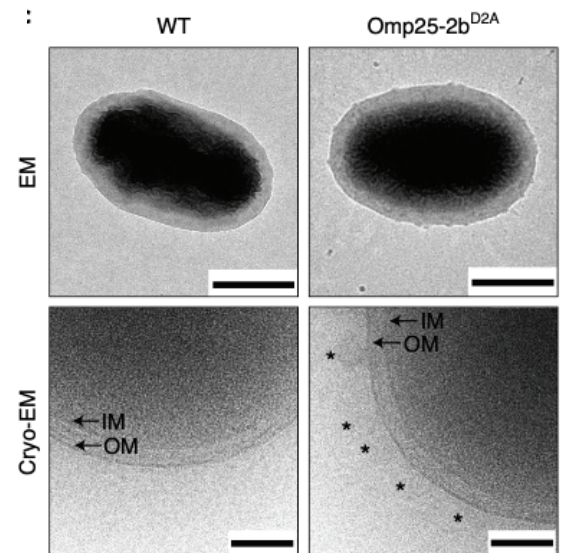


Figure 25. Des protéines en tonneau- β et une lipoprotéine sont attachées de manière covalente au PG chez des protéobactéries dépourvues de Lpp. A. Simulation moléculaire dynamique de l'enveloppe de *Coxiella burnetii*. Chez cette γ -protéobactérie dépourvue de Lpp, des protéines en tonneau- β et la lipoprotéine LimB attachent de manière covalente la ME au PG. B. Les muropeptides formés du disaccharide GlcNac-MurNac et du tripeptide L-Ala (A), D-iGlu (E) et mDAP (m) sont couplés aux protéines de *C. burnetii*. Le mDAP du peptide est attaché au résidu N-terminal des protéines en tonneau- β (glycine, en bleu, pour BbpA et BbpB, ou alanine, en vert, pour ala-BbpA). La lipoprotéine LimB est attachée au PG par un résidu lysine intrachaîne, en rouge. D'après Sandoz *et al.* 2021. C. Chez l' α -protéobactérie *Brucella abortus*, les protéines en tonneau- β sont attachées au PG par leur alanine N-terminale. Le second résidu aspartate (D), conservé chez ces protéines, est important pour le couplage de l'OMP au PG. D. La substitution du second résidu aspartate par une alanine d'Omp25-2b de *B. abortus* induit la vésiculation de la ME. La vésiculation de la ME indique que celle-ci n'est plus attachée au PG, et qu'effectivement, le résidu aspartate est important pour le couplage au PG. D'après Godessart *et al.* 2021.

Nichols *et al.* 2011; Yem et Wu 1978). La ME des cellules dépourvues de Lpp forme des vésicules extracellulaires, qui se caractérisent par une fuite du matériel périplasmique, témoignant de la déstabilisation de l'enveloppe (Cohen *et al.* 2017; Kulp et Kuehn 2010; Mathélié-Guinlet *et al.* 2020; Schwechheimer *et al.* 2014). Ces observations suggèrent que Lpp fonctionne comme une ancre protéique arrimant la ME au PG, empêchant ainsi qu'elle se dissocie de l'enveloppe. De manière cohérente, la plupart des phénotypes du mutant *lpp* sont partagés par le mutant exprimant le variant de Lpp délété de la lysine C-terminale, y compris la vésiculation de la ME (Asmar *et al.* 2017). De même, le mutant dépourvu des trois gènes *erfK*, *ybiS*, *ycfS* (*ldtA*, *ldtB*, *ldtC*) codant les Ldts qui lient Lpp au PG est caractérisé par la fuite de protéines périplasmiques (Sanders et Pavelka 2013). Toutefois, l'enveloppe de ce mutant n'a pas été visualisée par microscopie électronique.

2/3 des Lpp exprimées chez *E. coli* ne sont pas attachées de manière covalente au PG. Ces formes de Lpp restent sous forme libre dans le périplasma, mais conservent leur capacité d'interagir de façon non covalente avec le PG sans que les détails moléculaires de cette interaction soient déchiffrés (Asmar et Collet 2018). Une partie de ce pool de Lpp libre serait exposée à la surface de la cellule. En effet, Cowles et ses collègues ont montré que l'extrémité C-terminale des Lpp de forme libre pouvait être marquée par une sonde biotinylée réactive aux amines primaires, comme ceux présents chez la lysine C-terminale de Lpp (Cowles *et al.* 2011). Comme la sonde utilisée dans cette étude était imperméable à la membrane, la biotinylation ne devrait être réservée qu'à la surface de la bactérie. Ainsi, ces résultats indiquent qu'au moins une fraction de la Lpp libre est exposée à la surface contrairement à l'opinion générale selon laquelle toutes les lipoprotéines de la ME d'*E. coli* sont orientées vers le périplasma (Szewczyk et Collet 2016). De manière cohérente, la quantité de Lpp biotinylée était diminuée dans les cellules exprimant le variant Lpp dépourvu du résidu C-terminal Lys⁵⁸. Les auteurs ont suggéré que Lpp $\Delta 58$ est néanmoins biotinylée via la Lys⁵⁵. Effectivement, aucun marquage de Lpp n'a été détecté dans les cellules exprimant Lpp $\Delta 55-58$ (Cowles *et al.* 2011). La manière dont une telle fraction de Lpp traverse la ME pour atteindre la surface reste totalement inconnue. Contrairement à la forme de Lpp couplée au PG, le rôle de la forme libre de Lpp reste à définir. Une hypothèse est que les cellules maintiennent disponibles un pool de molécules Lpp libres pour le couplage covalent de la ME au PG au cours du cycle cellulaire ou en cas de stress. Ainsi, chez *E. coli*, ce pool de Lpp libre servirait à adapter rapidement le taux de liaisons Lpp-PG lors de l'augmentation des couplages i) en phase stationnaire (Asmar et Collet 2018; Glauner 1988), ii) lorsque les cellules sont traitées avec du mécillinaïne, un β -lactamine qui inhibe la D,D-transpeptidase monofonctionnelle PBP2 (Braun 1975), ou iii) lors de la délétion des gènes *ycbB* et *ynhG*, les enzymes impliquées dans la formation de couplages 3 \rightarrow 3 (Schwechheimer *et al.* 2014). Par ailleurs, on ne sait toutefois pas si l'augmentation du taux de Lpp couplé dans un mutant dépourvu de couplages 3 \rightarrow 3 est i) une stratégie permettant la stabilisation du PG en réponse au stress, ou ii) si cette augmentation est liée au fait que davantage de tripeptides sont disponibles pour une liaison avec Lpp (Asmar et Collet 2018). Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que la réticulation de Lpp au PG et la synthèse du PG sont étroitement liés.

Il a été montré que la longueur de Lpp définissait la taille du périplasma, plus précisément, que l'espacement de la ME à la couche de PG était proportionnel à la taille de Lpp (Asmar *et al.* 2017; Cohen *et al.* 2017). Ainsi, la distance entre la ME et la MI augmente dans les cellules exprimant des variants plus longs de Lpp (Asmar *et al.* 2017; Cohen *et al.* 2017). Par exemple, l'insertion de 14 ou 21 résidus

dans la séquence de Lpp a respectivement augmenté de 3 et 4 nm la distance entre la ME et la MI. Par ailleurs, la taille de nombreux systèmes traversant l'enveloppe bactérienne, comme les flagelles ou les senseurs de stress, est adaptée à celle du périplasme. D'une part, Cohen et ses collaborateurs ont montré que chez *Salmonella*, la longueur de la tige du flagelle était déterminée par la largeur de l'espace entre la ME et la MI (Cohen *et al.* 2017). En effet, le flagelle est une structure qui s'auto-assemble dans le périplasme jusqu'à rencontrer la ME, qui exerce une pression physique limitant l'élongation de celui-ci (Cohen *et al.* 2017). Ainsi, en augmentant la taille du périplasme par un allongement de Lpp, le flagelle a pu s'étendre au-delà de sa taille normale de 25 nm (Cohen *et al.* 2017). D'autre part, la taille des senseurs de stress semble être adaptée à la taille du périplasme pour la transduction du signal à travers l'enveloppe bactérienne. Par exemple, en cas de dommages du PG, la lipoprotéine RcsF, capteur de stress à la ME, interagit avec son partenaire IgaA à la MI afin d'activer la réponse Rcs. Or, Asmar et ses collègues ont montré que l'augmentation de la taille du périplasme, par l'augmentation de la longueur de Lpp, empêchait RcsF de transférer les signaux de stress à IgaA (Asmar *et al.* 2017). En revanche, la signalisation est rétablie lorsque la taille de la partie linker N-terminale de RcsF est augmentée, ce qui lui permet d'interagir à nouveau avec IgaA de l'autre côté du périplasme (Asmar *et al.* 2017). Ainsi, la conservation de la taille de Lpp chez les γ -protéobactéries aurait été contrainte par l'étroite coévolution entre la taille du périplasme et celle des systèmes protéiques traversant l'enveloppe.

Lpp est également impliquée dans le pouvoir pathogène de bactéries, en contribuant directement ou indirectement à leur virulence ou en modulant la réponse immunitaire de l'hôte. Par exemple, chez le pathogène humain *E. coli* O157:H7, la suppression du gène *lpp* déclenche le système Cpx, ce qui réduit l'invasivité des bactéries en diminuant la formation de biofilms (Uhlich *et al.* 2009). Le mutant *lpp* de *Salmonella typhimurium*, présente une virulence et une capacité d'invasion des cellules hôtes réduites probablement à cause de la diminution du taux d'expression de plusieurs facteurs importants, tels que les composants du système de sécrétion de type III et du flagelle (Fadl *et al.* 2006). Plus récemment, il a été démontré que le mutant *lpp* de la souche uropathogène d'*E. coli* CFT073 manifestait une capacité réduite à produire des polysaccharides capsulaires, un élément majeur de la virulence (Diao *et al.* 2017). Par ailleurs, la protéine Lpp d'*E. coli* contribue à l'activation d'une réponse inflammatoire des cellules épithéliales de l'homme, par le récepteur Toll TLR2 (Aliprantis *et al.* 1999; Lakshmikanth *et al.* 2016). Le récepteur TLR2 de type Toll (TLR), capable de reconnaître une large gamme de ligands, est responsable de l'inflammation des cellules épithéliales humaines. La capacité de TLR à reconnaître les lipoprotéines a notamment été exploitée dans le développement de lipopeptides synthétiques utilisés pour la vaccination (Zaman *et al.* 2013).

b. L'attachement covalent au PG de porines en tonneaux- β chez *Brucella abortus* et *Coxiella burnetii*

Comme cela était indiqué plus haut, Lpp n'a été identifiée que dans certaines familles de γ -protéobactéries, dont les Enterobacteriaceae, Vibrionaceae, Shewanellaceae et Pseudomonadaceae, ainsi que chez la δ -proteobactérie *Geobacter* (Asmar et Collet 2018; Mandela *et al.* 2022). Il convient de noter que certaines γ -protéobactéries comme *Legionella pneumophila* ou *Coxiella burnetii* ne

possèdent pas de Lpp (Sandoz *et al.* 2021). Étant donné l'importance de Lpp dans l'intégrité de l'enveloppe des bactéries, il est intrigant de voir que la plupart des protéobactéries (α -, β -, δ - et quelques γ -protéobactéries) ne possèdent pas de Lpp. Godessart et ses collaborateurs ont suggéré que chez ces bactéries, certaines autres protéines pouvaient assurer l'attachement covalent de la ME au PG (Godessart *et al.* 2021) (Fig. 25). Les auteurs ont étudié cette possibilité en analysant le PG de l' α -protéobactérie *Brucella abortus*, un pathogène intracellulaire à Gram-négatif responsable de la brucellose, une zoonose aux répercussions sociales et économiques majeures. Ainsi, l'analyse par LC-MS/MS des peptides liés au PG, a permis d'identifier sept protéines en tonneau- β (Omp2b, Omp25, Omp25c, Omp31, OmpW, OmpP et BAB1_0729) couplées de manière covalente au PG (Godessart *et al.* 2021) (Fig. 25.C). Cette étude a démontré pour la première fois que les porines en tonneau- β pouvaient être couplés au PG chez certaines bactéries. Par ailleurs, il est important de noter que la nature de la liaison de ces porines au PG diffère de celui de Lpp, car il ne fait pas intervenir une lysine C-terminale ; mais implique l'amine primaire portée par le C α du résidu L-Ala¹ N-terminal (Godessart *et al.* 2021). Cette étude a démontré que la gamme des protéines couplées au PG chez les bactéries didermes était beaucoup plus large qu'on ne l'avait pensé. Cette analyse a également démontré que des acides aminés autres que la lysine C-terminale pouvaient être liés au PG.

L'analyse du génome de *B. abortus* a révélé la présence de huit gènes *ldt* codant pour les Ldt1 à 8 (Godessart *et al.* 2021). L'expression hétérologue des gènes *ldt* et *omp25* de *B. abortus* chez *E. coli* a montré que les Ldts 1, 2 et 4 étaient capables d'attacher de façon covalente Omp25 au PG d'*E. coli* (Godessart *et al.* 2021). Par ailleurs, ces 3 Ldts forment un groupe monophylétique et sont les seules lipoprotéines parmi les 8 Ldts de *B. abortus*. L'analyse de la proportion des Omp25 et Omp2b liées au PG chez *B. abortus* a révélé que Ldt4 était principalement responsable du couplage de porines en tonneau- β au PG. Cependant, l'analyse du PG des mutants de *B. abortus* dépourvus de gènes *ldt1*, *ldt2* et *ldt3* a montré qu'une fraction des Omps restait couplée au PG. Cette observation suggère qu'au moins une autre enzyme non identifiée pourrait ancrer les Omps au PG chez *B. abortus* (Godessart *et al.* 2021). Les mêmes auteurs ont observé que l'intégrité de l'enveloppe était significativement impactée lorsque les gènes *ldt1*, *ldt2* et *ldt4* étaient délétés. Les phénotypes associés à la délétion de trois gènes *ldt* comprennent la formation de vésicules extracellulaires (comme chez le mutant *lpp*). Or, une telle vésiculation n'a été bien visible qu'après exposition des cellules à 50°C. Par ailleurs, la délétion de ces trois gènes *ldt* n'a causé aucune modification visible de la taille du périplasme suggérant qu'un autre mécanisme serait en jeu pour maintenir sa taille. De plus, dans un test avec des macrophages, les mutants *ldt* conservent une virulence identique à la souche sauvage (Godessart *et al.* 2021).

L'analyse des séquences de ces porines a montré qu'elles possédaient toutes un motif conservé alanyl-aspartyl situé en N-terminal de la protéine mature (après le clivage du peptide signal) (Fig. 25.C). En effet, la région N-terminale de ces porines constitue un linker entre le domaine en tonneau- β , situé dans la ME, et l'extrémité N-terminale, couplée au PG. Les auteurs ont trouvé que le motif alanyl-aspartyl N-terminal est présent chez de nombreuses Omps des Rhizobiales, y compris *Agrobacterium tumefaciens* (Godessart *et al.* 2021). La substitution de l'aspartate en position 2 des Omp25 et Omp2b par une alanine a aboli le couplage covalent de ces protéines au mDAP³ du PG, ce qui a entraîné la formation de vésicules de la ME à la surface de la cellule (Godessart *et al.* 2021) (Fig. 25.D). Cela suggère

que la charge négative de l'aspartate située après le résidu Ala¹ lié au PG est primordiale pour le couplage covalent. Un mécanisme similaire a pu être observé chez Lpp, puisque la présence d'un résidu antépénultième chargé positivement (arginine⁵⁷ ou lysine⁵⁷) semble être indispensable à son couplage chez *E. coli* (Zhang et Wu 1992).

Dans une étude publiée simultanément, Sandoz et ses collaborateurs ont cherché à identifier les protéines impliquées dans l'attachement de la ME au PG chez plusieurs bactéries dépourvues de Lpp (Sandoz et al. 2021). Les auteurs ont réalisé une analyse glycoprotéomique du PG issu de sept protéobactéries, dont *Campylobacter jejuni*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Helicobacter pylori*, *Myxococcus xanthus*, *Coxiella burnetii*, *Legionella pneumophila* et *Agrobacterium tumefaciens* (Sandoz et al. 2021). Cette analyse a révélé que plusieurs protéines en tonneau- β , composées de 8 ou 16 brins, étaient attachées de manière covalente au PG chez *C. burnetii*, *L. pneumophila* et *A. tumefaciens*, mais pas chez les autres bactéries analysées (Sandoz et al. 2021). Chez *A. tumefaciens*, par exemple, six protéines en tonneau- β étaient attachées au PG, notamment ATU1020, ATU1021, ATU3708, ATU1131 (RpoB), ATU4026 et ATU2159 (Sandoz et al. 2021). *L. pneumophila* avait trois protéines en tonneaux- β attachées au PG, dont MOMP (major Omp). Chez *C. burnetii*, deux protéines en tonneau- β (BbpA (CBU0307), BbpB (CBU0311)), ainsi qu'une lipoprotéine impliquée dans la liaison des cations divalents (LimB, CBU_1224a) de 7.2 kDa étaient attachées au PG (Battisti, Hicks, et Minnick 2011; Sandoz et al. 2021).

Ces protéines ne présentent que peu de similitudes de séquence entre elles (Sandoz et al. 2021). Néanmoins, les protéines de *L. pneumophila* et de *C. burnetii* couplées au PG possèdent toutes un résidu glycyll N-terminal (Glycine), tandis que celles d'*A. tumefaciens* portent un résidu alanyl en N-terminal (Sandoz et al. 2021) (Fig. 25.B). Cette étude a démontré une variabilité importante du résidu qui suit le résidu couplé au peptide-tige. Ainsi, le résidu +2 est la glycine chez *C. burnetii*, une thréonine chez *L. pneumophila* et une aspartate chez *A. tumefaciens*.

De manière inattendue, l'étude de Sandoz et ses collaborateurs a montré que la lipoprotéine LimB était couplée par un résidu de lysine²¹ « interne », c'est-à-dire situé en plein milieu d'une hélice- α , ce qui diffère du modèle canonique Lpp (Fig. 25.A et 25.B). Par ailleurs, les résidus avoisinant la Lys²¹ sont une alanine²⁰ et une leucine²². Il semblerait donc que d'une part, la présence d'une structure secondaire telle que l'hélice- α n'empêche pas la reconnaissance de la lysine par la L,D-transpeptidase ; et que d'autre part, contrairement à Lpp, le couplage de LimB ne nécessite pas la présence d'un résidu chargé positivement (lysine ou arginine) proche de la lysine liée au PG. En revanche, tout comme Lpp, le couplage a lieu au niveau du groupe ϵ -amine de la chaîne latérale de la lysine (Braun et Rehn 1969; Sandoz et al. 2021).

De la même façon que Lpp chez les γ -protéobactéries, il est probable que certaines de ces protéines contrôlent la taille du périplasme chez les bactéries respectives. Par exemple, des modèles atomiques réalisés avec *C. burnetii* ont simulé l'attachement de la ME au PG par les protéines en tonneau- β (BbpA et BbpB) et la lipoprotéine LimB. Ces modèles ont prédit que l'espacement entre la ME et le PG chez *C. burnetii* serait de 30 à 50 Å, donc plus petite que celle conférée par Lpp chez *E. coli* (~85 Å) (Sandoz et al. 2021). Ce résultat est cohérent avec la taille de LimB mature de 45 résidus

(Battisti 2011). Ces données suggèrent que l'attachement de la ME par les protéines en tonneau- β pourrait conférer une architecture unique à l'enveloppe de *C. burnetii*. Par ailleurs, il est également probable que des complexes protéiques traversant le périplasma, tels que les systèmes de sécrétion et les senseurs de stress aient coévolué avec l'architecture de l'enveloppe particulière de cette bactérie (Asmar *et al.* 2017; Cohen *et al.* 2017; Sandoz *et al.* 2021).

Les auteurs ont ensuite cherché à déterminer quelles étaient les L,D-transpeptidases impliquées dans l'attachement des protéines au PG chez *C. burnetii*. L'analyse de son génome révèle que celle-ci possède 10 gènes codant les Ldt putatives (Sandoz *et al.* 2021). Une étude précédente a révélé que les gènes codant cinq de ces Ldts (Ldt1, 2, 3, 6, 9) étaient 7 fois plus exprimés en phase stationnaire qu'en phase exponentielle (Sandoz *et al.* 2016). Les auteurs ont ensuite montré que BbpA était davantage couplée au PG en phase stationnaire qu'en phase exponentielle, alors que la quantité de LimB couplée au PG ne varie pas au cours du cycle cellulaire (Sandoz *et al.* 2021). L'analyse du PG des mutants *ldt1*, *ldt2* et *ldt3* a permis de déterminer que le couplage de certaines protéines était dépendant de Ldt2. Par exemple, Ldt2 est impliquée dans l'attachement covalent de BbpA et BbpB au PG. Cependant, Ldt2 n'est pas capable de coupler ala-BbpA (un variant de BbpA possédant un résidu Alanine juste avant le site de clivage du peptide-signal). Par ailleurs, les mutants *ldt2* et *ldt3* ont montré un phénotype similaire au mutant *lpp* d'*E. coli*, caractérisé par la vésiculation de la ME, tandis que le mutant *ldt3* n'a pas impacté le couplage covalent des protéines en tonneau- β au PG (Sandoz *et al.* 2021). Parmi les autres phénotypes notables, les auteurs ont remarqué que la phase exponentielle de croissance est retardée chez le mutant *ldt2*, ce qui suggère que le couplage covalent des Omps est important pour les fonctions métaboliques de la cellule. Par ailleurs, le taux d'expression maximal de *limB* survient en phase exponentielle de croissance (Battisti *et al.* 2011), alors que la quantité de LimB couplée au PG ne varie pas au cours du cycle cellulaire (Sandoz *et al.* 2021). Ainsi, environ 40 % du pool de protéine est couplé de manière covalente au PG tout au long du cycle cellulaire. De plus, l'attachement de LimB au PG est indépendant de Ldt1, de Ldt2 et de Ldt3. Les auteurs n'ont cependant pas identifié la Ldt responsable du couplage de LimB car seules les Ldt1, 2 et 3 ont pu être inactivées (Sandoz *et al.* 2021).

Ainsi, ces deux études récentes ont montré que chez certaines protéobactéries dépourvues de *lpp*, les protéines en tonneau- β constituaient un mécanisme d'attachement de la ME analogue au système de Lpp (Braun *et Rehn* 1969; Godessart *et al.* 2021; Sandoz *et al.* 2021) (Fig. 25.A). Leur rôle est probablement lié à la stabilisation de l'enveloppe. Cependant, il faut rappeler que les protéines en tonneau- β jouent de nombreux rôles chez les bactéries. Les Omps comptent en effet parmi les protéines les plus abondantes que l'on trouve à la surface des bactéries (Aldea *et al.* 1980). Elles modulent la physiologie bactérienne, les interactions hôte-pathogène et transportent de petites molécules à travers la ME, comme les antibiotiques hydrophiles tels que les β -lactames et les fluoroquinolones (Fairman *et al.* 2011; Hermansen, Linke *et Leo* 2022). On ne peut pas non plus exclure la possibilité que le couplage au PG assiste, ou est indispensable, aux fonctions cellulaires des protéines en tonneau- β .

Ces études apportent d'importants éclairages concernant les mécanismes du couplage covalent des protéines au PG. Elles révèlent que celui-ci ne se limite ni aux lipoprotéines, ni aux résidus lysine C-terminaux. Bien au contraire, le groupe amino- ϵ de la chaîne latérale d'une lysine située en plein

milieu d'une séquence protéique peut être couplé au PG. Plus important encore, l'amine primaire portée par le C α de la Glycine¹ ou de l'Alanine¹ peut être couplés au peptides-tiges si ces résidus sont situés en N-terminal de la protéine. Enfin, la nature du résidu suivant, n+2 pourrait être aussi différente selon la bactérie et/ou de la protéine considérée, une aspartate, une thréonine ou bien une glycine. On peut souligner que les résidus impliqués dans le couplage dépendent de l'appartenance à un groupe de bactéries. Par exemple, l'alanine est retrouvée chez les Rhizobiales (*B. abortus* et *A. tumefaciens*), alors que la glycine est retrouvée chez *L. pneumophila* et *C. burnetii*. Notons que la glycine et l'alanine sont les deux plus petits acides aminés, possédant respectivement aucune chaîne latérale ou une chaîne latérale à un carbone. Il est possible que de plus grandes chaînes latérales créent un encombrement stérique défavorisant le couplage de la protéine. Pour cette raison, il est possible que seuls les acides-aminés à chaîne latérale courte soient couplés par leur amine N-terminale. A l'inverse, la longue chaîne latérale à 4 carbones de la lysine faciliterait l'accès des transpeptidases au groupe amine- ϵ .

VI) *Dickeya dadantii*, comme un modèle d'étude du couplage covalent des protéines au PG

1) *Dickeya dadantii*, une γ -protéobactérie phytopathogène

Utiliser différents types de bactéries dans la recherche aide à mieux comprendre la diversité du monde bactérien, tout en reconnaissant que ces modèles ne peuvent jamais la représenter exhaustivement. Le choix de ces modèles est souvent fondé sur des raisons pratiques, comme : i) la facilité de manipulation au laboratoire (conditions de culture simple et temps de génération rapide, comme *E. coli*), ii) la présence d'outils génétiques, iii) l'absence de pathogénicité pour l'homme, et iv) son intérêt dans un contexte médical, social, économique ou environnemental. Ces dernières raisons sont souvent les plus importantes, c'est pourquoi le PG de nombreux agents pathogènes humains est étudié. On peut citer entre autres les bactéries pathogènes signalées par l'OMS, nécessitant des efforts et des investissements financiers importants pour la recherche et développement d'antibiotiques, telles que *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. faecium*, *S. aureus*, *H. pylori*, *S. pneumoniae* ou encore *H. influenzae* (Tacconelli et al. 2018).

La restriction des modèles bactériens à un nombre limité d'espèces, choisies pour des raisons pratiques ou historiques, restreint la portée des connaissances acquises. Cependant, pour une compréhension complète de la diversité bactérienne et pour enrichir les connaissances en microbiologie, il est essentiel de mener des recherches sur un large éventail d'espèces bactériennes colonisant différents milieux, car chaque modèle bactérien peut potentiellement présenter des caractéristiques biologiques intéressantes ou uniques. Bien qu'il n'existe pas de modèle idéal, l'étude du PG d'une bactérie non pathogène pour l'homme, *Dickeya dadantii*, nous a permis de mettre en évidence un phénomène original et inattendu que j'exposerai dans les résultats.

a. Historique et taxonomie

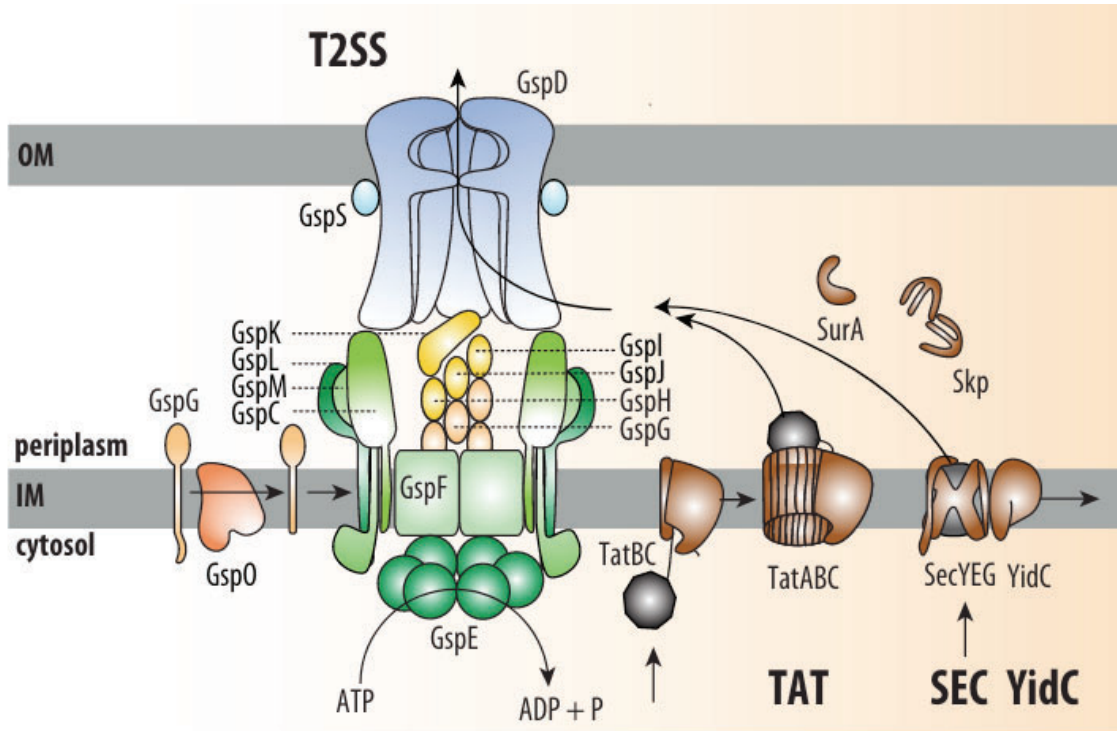
En 2005, à la suite d'analyses de séquences de l'ARN 16S, le genre *Pectobacterium* regroupant les entérobactéries pectinolytiques a été subdivisé en deux genres distincts : *Pectobacterium* et *Dickeya*, en référence au phytopathologiste Robert S. Dickey (Samson *et al.* 2005). Actuellement, Le genre *Dickeya* regroupe 12 espèces bactériennes : *Dickeya solani*, *Dickeya poacephila*, *Dickeya undicola*, *Dickeya lacustris*, *Dickeya zea*, *Dickeya parazeae*, *Dickeya dianthicola*, *Dickeya fangzhongdai*, *Dickeya oryzae*, *Dickeya aquatica*, *Dickeya chrysanthemi* et *Dickeya dadantii*. A noter que l'espèce *Dickeya paradisiaca* a été reclassée dans un nouveau genre sous le nom de *Musicola paradisiaca* (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.* 2021). Parmi ces bactéries, *D. solani* et *D. dianthicola* sont les deux espèces responsables de la majorité des infections de pommes de terre. *D. solani* est une espèce émergente qui depuis 2010 se propage très efficacement en Europe et est souvent considérée comme le pathogène le plus important du genre *Dickeya* (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.* 2021). Ainsi, les bactéries pectinolytiques *Dickeya* et Pectobacteriaceae engendrent une perte économique estimée à 46 millions d'euros par an en Europe (Dupuis, Nkuriyngoma, et Van Gijsegem 2021).

Dickeya dadantii, anciennement nommée *Erwinia chrysanthemi*, appartient à l'ordre des Enterobacterales et à la famille des Pectobacteriaceae. Bien que les membres des Enterobacteriaceae sont généralement des pathogènes cliniques retrouvés dans le tractus digestif des animaux ou de l'homme, les Pectobacteriaceae sont des pathogènes de végétaux (Janda et Abbott 2021). *D. dadantii* est une γ -protéobactérie diderme à LPS, à coloration Gram-négative dont les cellules possèdent une forme de bacille droit, mobile, non sporulée et de nombreux flagelles péritriches. Les *Dickeya* ont été identifiées dans de nombreux réservoirs écologiques comme l'eau des lacs, le sol, et des végétaux. En 1980, des chercheurs français ont choisi la souche *Dickeya dadantii* 3937 comme modèle pour réaliser des études génétiques. Cette souche, initialement isolée à partir de la violette africaine, est depuis devenue un modèle d'étude pour la communauté internationale.

b. Pathogénie

Les espèces du genre *Dickeya* sont réparties sur toute la surface du globe, dans des régions tropicales, subtropicales et tempérées (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.* 2021). Ainsi, les températures de 22°C à 34°C et une humidité élevée constituent les conditions optimales pour le développement de ces bactéries. À des latitudes plus élevées, *Dickeya* se développe principalement pendant les mois chauds et humides de l'été (Toth *et al.* 2011). Les *Dickeya* sont des agents phytopathogènes nécrotrophes dits « à large spectre d'hôtes » tant les plantes qu'elles infectent sont variées (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.* 2021). Elles infectent les parties charnues et succulentes des plantes, telles que les tubercules, les rhizomes, les tiges et les feuilles, à n'importe quel stade de leur cycle de vie. Les végétaux infectés comprennent des plantes d'intérêt économique comme les tubercules de pomme de terre, les bulbes de légumes, les cultures ornementales dont les orchidées *Phalaenopsis* (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.* 2021; Zhang *et al.* 2018). Les cas d'infection de branches de pommier au Japon et au Brésil par *Dickeya dadantii*, et de tronc de poirier en Chine par *D. fangzhongdai* ont récemment été reportés (Ogoshi *et al.* 2019; Tian *et al.* 2016). La gamme d'hôtes de *D. dadantii* continue de s'étendre à mesure que de nouvelles espèces sensibles sont documentées.

A.



B.

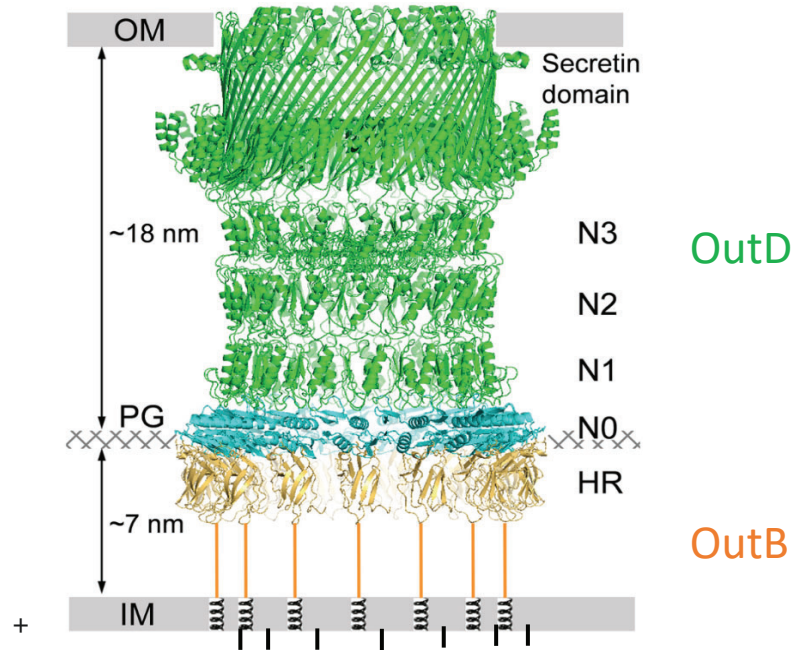


Figure 26. A. Organisation du système de sécrétion de type II (T2SS). Le T2SS est un complexe multiprotéique traversant l'enveloppe bactérienne et constitué de 12 composants essentiels de GspC à GspO. Certains T2SS possèdent des composants auxiliaires GspA, GspB GspN et GspS (ici, seul GspS est représenté). L'ATPase cytoplasmique GspE génère l'énergie nécessaire au fonctionnement du T2SS. GspE est associée aux protéines GpsC, GspF, GspL et GspM qui constituent une plateforme d'assemblage dans la MI. Les protéines GspG, GspH, GspI, GspJ et GspK forment l'endopilus, propulsant les substrats du T2SS à travers le pore de la ME formé par la sécrétine GspD. La sécrétine est un canal pentadodécamérique de GspD dont la mise en place à la ME est assistée par la pilotine GspS. Les substrats du T2SS sont adressés dans le périplasm par les translocons Sec ou Tat. **B. Modèle du complexe entre le canal de la sécrétine (OutD) et la protéine d'échafaudage OutB placé dans le contexte de l'enveloppe de *D. dadantii*.** La partie apicale C-terminale de la sécrétine formée de 15 unités d'OutD (en vert) traverse la membrane externe (OM). Le reste du canal de la sécrétine s'étend de 18 nm dans le périplasm, et la partie N-terminale est composée de cinq domaines N0, N1, N2, N3 et le domaine « sécrétine ». Le domaine N0 d'OutD (en bleu clair) est situé proche du PG, et interagit avec le domaine HR d'OutB (en jaune doré). OutB est ancrée dans la membrane interne (IM) via un segment transmembranaire N-terminal. OutB assiste la mise en place de la sécrétine dans l'enveloppe (Zhang *et al.* 2022). D'après Shaliutina-Loginova *et al.* 2023 et Zhang *et al.* 2022.

Dickeya est fortement attirée par chémoattraction par les jasmonates. Les jasmonates sont des phytohormones régulant la production de composés chimiques de défense qui jouent des rôles essentiels dans la réponse aux stress environnementaux et dans le développement des plantes (Antúñez-Lamas *et al.* 2009). La bactérie pénètre préférentiellement par des tissus lésés ou les hydathodes de la plante (Kastelein *et al.* 2021). L'infection provoque dans un premier temps des symptômes localisés qui peuvent se propager à toute la plante dans les phases d'infection plus avancées (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.* 2020). En effet, grâce à leur motilité, les bactéries continuent de se propager et de se multiplier dans la plante, se déplaçant dans les espaces intercellulaires. De plus, la bactérie peut être transportée dans de nouvelles régions de la plante via les vaisseaux de xylème, et causer des dégâts dans d'autres organes (Antúñez-Lamas *et al.* 2009). En outre, d'autres plantes peuvent être infectés par la propagation des bactéries due aux éclaboussures d'eau provenant des plantes infectées, ou par un matériel de jardinage contaminé ou bien par les insectes attirés par les composants volatiles comme le butanediol (Effantin *et al.* 2011). Même si les bactéries du genre *Dickeya* ont été identifiées chez les insectes et certains animaux (limaces), leur rôle comme vecteurs de la propagation du pathogène dans la nature n'a jamais été démontré. Par ailleurs, *D. dadantii* produit des entomotoxines de la famille Cyt (comme *Bacillus thuringiensis*) et est capable de tuer les pucerons dans les conditions de laboratoire. Toutefois, cette bactérie n'est pas considérée comme un pathogène d'insectes (Costechareyre *et al.* 2012; Kumar *et al.* 2021).

L'infection de la plante par les Pectobactéries provoque des symptômes tels que la jambe noire ainsi que la pourriture molle, qui se caractérisent par la nécrose, le flétrissement et une macération progressive des tissus de la plante (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.* 2020). La jambe noire est caractérisée par une pourriture noire et humide à la base de la tige du plan du végétal, tandis que la pourriture molle se caractérise par un brunissement et une liquéfaction des tissus. Ces symptômes sont accompagnés par des lésions extérieures enfoncées et fissurées ayant un intérieur brun en coupe transversale dans les bulbes et les tubercules souterrains, ainsi qu'une décoloration vasculaire des tiges. Le succès de l'infection de la plante est permis par la sécrétion à travers l'enveloppe, dans le milieu extérieur, d'enzymes pectinolytiques capables de ramollir et de dégrader la paroi cellulaire des plantes, dont les produits de dégradation constituent une source nutritive qui favorise la croissance des bactéries (Hassan *et al.* 2013). Par ailleurs, la bactérie sécrète d'autres facteurs de virulence à travers l'enveloppe, grâce au système de sécrétion de type II (T2SS) (Lu 2019). Les *Dickeya* possèdent également un système de sécrétion de type I (T1SS), le système Hrp de type III (T3SS), le T4SS, le T5SS et le T6SS (Matilla, Monson, et Salmond 2023), ainsi que des systèmes flagellaires permettant sa motilité par swimming ou swarming.

Chez *D. dadantii*, l'expression des gènes de virulence est régulée par deux systèmes de quorum-sensing (*vfm* et *expl/R*), répondant aux facteurs environnementaux (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.* 2022; Nasser *et al.* 2013; Potrykus *et al.* 2018). Par exemple, trois régulateurs KdgR, PecS et PecT répriment l'expression des gènes codant pour les pectinases chez *Dickeya*, tandis que CRP et FIS sont des activateurs de la transcription des gènes de pectinases (Duprey *et al.* 2016). Lors de l'infection de la plante, la bactérie a développé une stratégie permettant une attaque coordonnée lorsque la densité cellulaire atteint un niveau suffisant. Cela permet d'éviter une détection précoce par le système immunitaire de l'hôte (Nasser *et al.* 2013). Le développement en nombre permet d'initier une attaque

suffisamment importante pour surpasser les capacités de défense de l'hôte, rendant l'infection rapide et inévitable. Le stade initial de développement des cellules s'appelle la phase asymptomatique, tandis que la phase symptomatique correspond à la phase de sécrétion de facteurs de virulence caractérisée par l'apparition des symptômes chez l'hôte. Pour cela, les *Dickeya* mettent en place divers processus permettant de limiter les effets de la réponse végétale. Notamment alcalinisation du pH par sécrétion de butanediol, qui permet aux pectinases d'opérer dans un pH optimal, ainsi que la sécrétion d'une molécule antioxydante comme l'indigoïdine (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.* 2020). Par ailleurs, ce pigment bleu insoluble dans l'eau, apparaît dans les colonies bactériennes comme une caractéristique chimiotaxonomique des *Dickeya* (Reverchon *et al.* 2002).

Malgré sa mauvaise réputation dans le milieu agricole, *D. dadantii* est mise à contribution à des fins positives dans d'autres domaines. La plus noble de ses contributions se trouve dans le domaine médical, où l'asparaginase produite par *D. dadantii* est employée pour le traitement de la leucémie lymphoblastique aiguë (LLA) et du lymphome non hodgkinien (Alexandrova *et al.* 2022). En conjonction avec d'autres agents chimiothérapeutiques, l'asparaginase de *D. dadantii* est une alternative pour les patients ayant fait des réactions allergiques à l'asparaginase dérivée d'*E. coli* (Elspar ou pegaspargase) (Alexandrova *et al.* 2022). Aussi, bénéficiant d'une forte impulsion gouvernementale en faveur de l'augmentation des ressources en carburants renouvelables, la capacité de *D. dadantii* à dégrader et fermenter les parois cellulaires est étudiée pour son utilisation dans la production de bio-carburant. Notamment, certains gènes de *D. dadantii* ont été clônés chez *E. coli* afin de permettre la dégradation de la pectine (Edwards *et al.* 2011; Zink *et al.* 1985). Plus récemment, des recherches tentent d'évaluer le potentiel de *D. dadantii* en industrie aviaire, comme supplément alimentaire pour augmenter l'apport calorique des nutriments des volailles en facilitant l'ingestion de la pectine de l'alimentation (Dittoe *et al.* 2020). L'industrie textile pourrait bénéficier de *D. dadantii*, car les pectinases pourraient servir à digérer plus rapidement la pectine dans le processus de dépectination des fibres de ramie, optimisant ainsi le processus de fabrication de textiles à partir de cette plante (Cheng *et al.* 2019; Ray Chaudhuri *et al.* 2020).

2) [Le T2SS](#)

Au moins 11 systèmes de sécrétion (T1SS à T11SS) ont été identifiés chez les bactéries à Gram-négatif, parmi lesquels le T7SS est spécifique de Mycobactéries qui possèdent une enveloppe particulière (Fig. 2) (Filloux 2022; Nicholson *et al.* 2022). Les systèmes de sécrétion diffèrent en termes d'architecture, d'origine, de source d'énergie et du type de substrats qu'ils transportent à travers l'enveloppe bactérienne (Shaliutina-Loginova *et al.* 2023). Le T2SS est l'un des systèmes de transport bactérien les mieux étudiés. Il permet aux bactéries d'exporter des effecteurs protéiques déjà repliés à travers l'enveloppe bactérienne. En effet, le T2SS forme un large pore dans la ME, à travers lequel les effecteurs sont soit acheminés dans le milieu extracellulaire, soit acheminés à la surface de la ME (Ferrandez *et al.* 2008; Wooldridge 2009; Zhang *et al.* 2022) (Fig. 26.A). La pullulanase PulA de *Klebsiella oxytoca* est l'exemple le plus connu de protéine adressée à la ME par le T2SS (Pugsley 1993). De même, la pectate lyase PnlH de *D. dadantii* est un substrat du T2SS ancré par un peptide-signal TAT non clivable à la ME (Ferrandez *et al.* 2008).

Le T2SS est largement répandu chez les protéobactéries, particulièrement chez les γ - et β -, mais également chez certaines α - et δ - protéobactéries, *Bacteroidetes* et *Deferribacteres* (Beeby 2019; Denise *et al.* 2019, 2020). Le T2SS est un facteur de virulence majeur chez de nombreux agents pathogènes humains comme *Acinetobacter baumannii*, *Vibrio cholerae*, *Legionella pneumophila*, mais également des agents pathogènes de plantes comme *Dickeya* et *Pectobacterium* (Elhosseiny *et Attia* 2018; Sandkvist 2001; White *et Cianciotto* 2019). Les effecteurs sécrétés par le T2SS permettent aux bactéries de coloniser des niches écologiques variées et d'accroître leur compétitivité, ainsi que leur pouvoir pathogène (Cianciotto *et White* 2017; Denise *et al.* 2019; Gu *et al.* 2017). Les protéines sécrétées par le T2SS possèdent un peptide signal N-terminal qui permet leur translocation à travers la membrane cytoplasmique via le système SecYEG ou Tat (Fig. 26.A). Une fois dans le périplasma, les protéines transportées par le translocon Sec sont repliées et prises en charge par la machinerie du T2SS (Voulhoux *et al.* 2001). Les protéines transportées par le translocon Tat, déjà repliées, sont directement prises en charge par la machinerie du T2SS (Voulhoux *et al.* 2001). Le T2SS est un complexe multiprotéique constitué de 12 à 15 composants cœur hautement conservés. Les composants du T2SS sont souvent nommés par le terme générique Gsp (General Secretary Pathway), suivi d'une lettre correspondant au nom de la protéine (Korotkov *et al.* 2012) (Fig. 26.A). Or, certains T2SS possèdent une nomenclature « historique » propre à la bactérie étudiée. Par exemple, le T2SS de *Klebsiella oxytoca* est nommé Pul (la pullulanase Pula en est l'unique substrat), le T2SS de *Pseudomonas aeruginosa* est nommé Xcp, *Legionella pneumophila*, Lsp, celui d'*Aeromonas hydrophila*, Exe, et enfin, le T2SS de *Dickeya* et *Pectobacterium* est nommé Out. Souvent, comme chez *Dickeya* et *Klebsiella*, les composants du T2SS sont codés par un cluster de gènes *gspC* à *gspM* et *gspO* organisés en opéron (Nivaskumar *et Francetic* 2014; Sandkvist 2001). Cependant, ce n'est pas le cas pour toutes les bactéries, chez lesquelles les gènes *gsp* sont répartis en plusieurs *loci* et opérons. Les composants cœur du T2SS sont organisés en homo-multimères (par exemple hexamère pour l'ATPase GspE, ou pentadécamère pour la sécrétine GspD) qui s'assemblent pour former une machinerie multiprotéique enchâssée dans l'enveloppe bactérienne. Certains T2SS possèdent également des composants dits auxiliaires comme GspA, GspB, GspN et GspS (Howard *et al.* 2019; Thomassin *et al.* 2017) (Fig. 26.A et 26.B).

La machinerie du T2SS peut être décomposée en quatre blocs structuraux (Fig. 26.A). Premièrement, l'ATPase cytoplasmique GspE, fournit l'énergie nécessaire au fonctionnement de la machinerie. Ensuite, GspE est associée avec les composants de la plateforme d'assemblage qui est située dans la membrane cytoplasmique et constituée de plusieurs copies de GspC, GspF, GspL et GspM (Py *et al.* 1999; Py *et al.* 2001). Les composants de cette plateforme participent au recrutement des protéines à sécréter et à la formation d'un court pilus dans le périplasma, appelé endopilus. L'endopilus est composé majoritairement de la pseudopiline GspG, tandis que les pseudopilines mineures, GspH, GspI, GspJ et GspK, participent à l'initiation de l'endopilus et/ou forment sa pointe (Gerbaud *et al.* 2023). On pense que l'endopilus propulse des protéines à travers le pore dans la ME, constitué de 15 unités de sécrétine GspD (Fig. 26.A et 26.B). Ainsi le canal pentadodécamérique formé par la sécrétine est un élément-clé du T2SS. Une large région N-terminale de la sécrétine est comprise dans le périplasma où, ensemble avec les composants de la plateforme de la MI, elle participe au recrutement des protéines à sécréter. Le transport des monomères de la sécrétine (~70 kDa) à travers

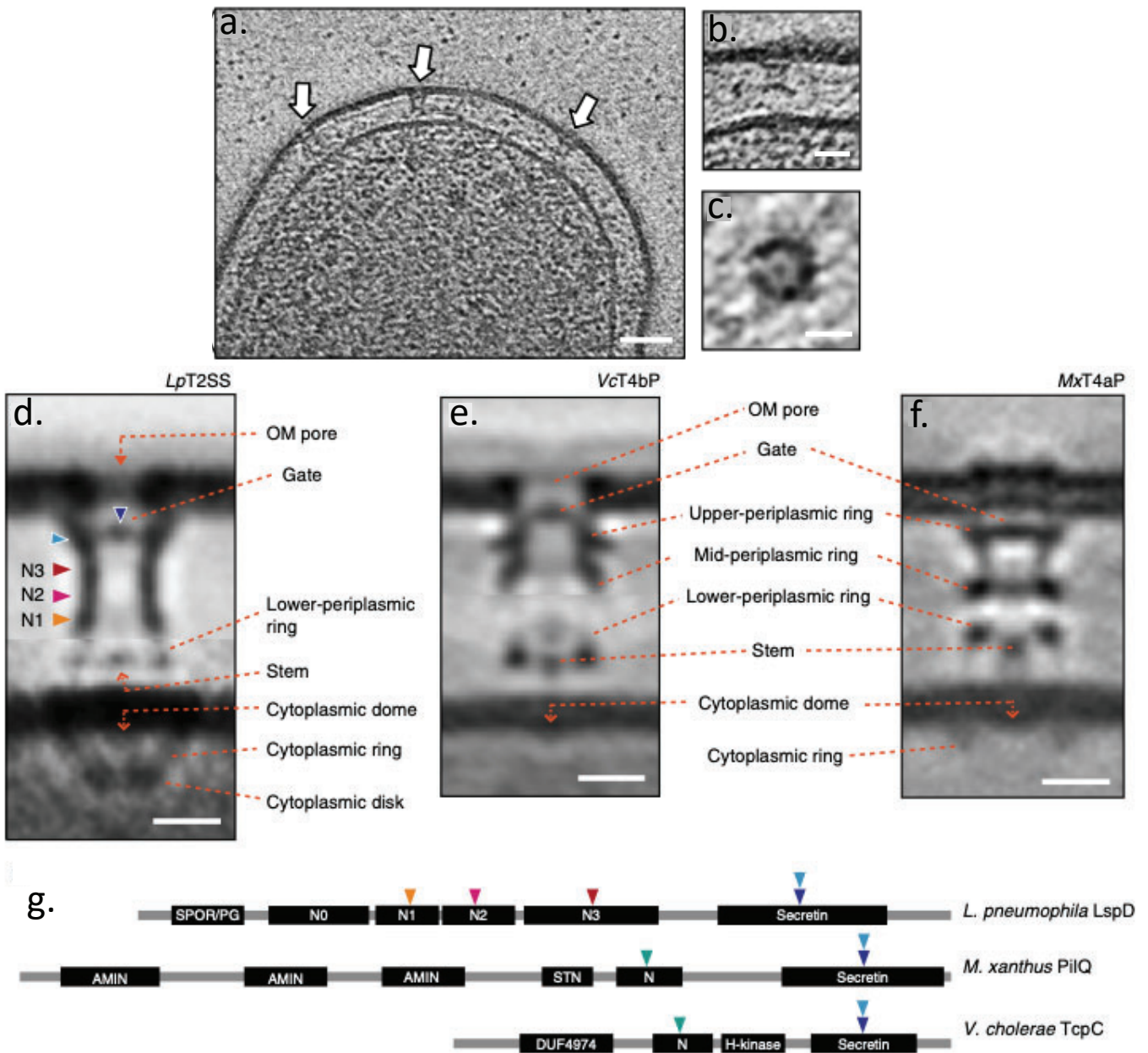


Figure 27. Visualisation du système de sécrétion de type II (T2SS) par cryo-EM chez *Legionella pneumophila*. **a.** Pôle cellulaire de *L. pneumophila*. Les flèches blanches indiquent des complexes putatifs de T2SS. **b.** Image rapprochée d'un complexe de T2SS, vue de côté (**b**) et d'en face (**c**). Tomogrammes moyennés des complexes de T2SS de *L. pneumophila* (**d**) et de système de pili de type IV (T4P) de *Vibrio cholerae* (**e**) et de *Myxococcus xanthus* (**f**). **g.** Domaines de la sécrétine LspD du T2SS de *L. pneumophila*, de la sécrétine PilQ du T4P de *M. xanthus* et de la sécrétine TcpC du T4P de *V. cholerae*. Les régions protéiques correspondant à des densités sur les tomogrammes dans les panels **d-e** sont indiquées par des pointes de flèches. SPOR/PG, domaine de liaison non covalent au PG. Barres d'échelle : 50 nm (**a.**), 20 nm (**b.**), 10 nm (**c.**), et 10 nm (**d-f.**). D'après Ghosal *et al.* 2019.

le périplasme, et son assemblage à la ME nécessitent une intervention de protéines « chaperons ». Ainsi, il a été montré que la mise en place de la sécrétine de *P. aeruginosa* était dépendante du système BAM (Hoang *et al.* 2011). Cependant, chez les autres bactéries, l'adressage et la mise en place du canal de la sécrétine sont souvent assistés par les composants auxiliaires, GspA, GspB et GspS. GspS est une lipoprotéine communément appelée pilotine qui interagit avec le domaine C-terminal de la sécrétine et assiste à son adressage et à l'assemblage dans le ME (Strozen *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2022) (Fig. 26.A). Selon la bactérie, le T2SS peut être associé à une pilotine GspS α ou GspS β , qui ne partagent aucune similarité structurale, bien qu'elles effectuent la même fonction vis-à-vis de leur sécrétine respective (Strozen *et al.* 2012; Howard *et al.* 2019). Chez certaines bactéries, comme *Aeromonas* et *Vibrio*, la mise en place de la sécrétine est assistée par un couple des protéines de la membrane cytoplasmique, GspA et GspB (Strozen *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2022). Chez *V. vulnificus*, *Photobacterium* et *Colwellia*, GspA et B sont fusionnées en un seul polypeptide ce qui illustre un lien fonctionnel étroit entre ces deux protéines (Zhang *et al.* 2022). Cependant, *Dickeya* et certaines autres bactéries n'ont pas de GspA mais seulement GspB et GspS.

a. Effecteurs

En raison de leur importance pour la virulence, une majorité des T2SSs caractérisés à ce jour sont directement impliqués dans le pouvoir pathogène de bactéries. Chez les agents pathogènes de l'homme, comme *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Chlamydia* et *Escherichia coli*, le T2SS sécrète des enzymes permettant l'invasion de l'hôte, telles que des métalloprotéases, des lipases, des protéines d'adhésion aux cellules épithéliales ou encore des phosphatases alcalines (Cianciotto *et al.* 2017; Korotkov *et al.* Sandkvist 2019). En revanche, chez le pathogène de plante *D. dadantii*, les enzymes sécrétées par le T2SS sont majoritairement impliquées dans la dégradation de la paroi cellulaire des végétaux, et notamment de la pectine. Ainsi, le système Out de *D. dadantii* assure la sécrétion d'au moins 20 protéines, parmi lesquelles on compte : 9 endo-pectates lyases (PelA, PelB, PelC, PelD, PelE, PelI, PelL, PelN et PelZ), 3 pectine estérases (PemaA, PaeY et FaeD), la rhamnogalacturonate lyase (RhiE), l'unique cellulase (CelZ) et le facteur de virulence (AvrL) (Aymeric *et al.* 1988; Henrissat *et al.* 1995; Kazemi-Pour *et al.* 2004; Laatu *et al.* Condemine 2003; Shevchik *et al.* Hugouvieux-Cotte-Pattat 1997 ; Tendiuk *et al.* 2022). Les études plus récentes ont démontré une versatilité encore plus grande du système Out qui sécrète également quelques autres effecteurs de nature différente : la protéine chélatrice du fer, IbpS (Liu *et al.* 2019), l'expansine YoaJ, ou encore les facteurs de virulence SvfA et SvfB (DUF 4879) et VirK (Condemine *et al.* Le Derout 2022).

b. OutD, la sécrétine, impliquée dans la translocation des protéines repliées à travers la ME.

Les 15 sous-unités GspD forment ensemble le canal de la sécrétine. Ce canal perce la ME et s'étend sur une longueur de 18 nm à l'intérieur du périplasme (Yan *et al.* 2017). Curieusement, seul le segment apical de la sécrétine traverse la ME. Celui-ci est constitué d'une boucle hélicoïdale amphipathique et d'un feuillet- β (Korotkov *et al.* 2009). Le reste du canal de la sécrétine se trouve dans

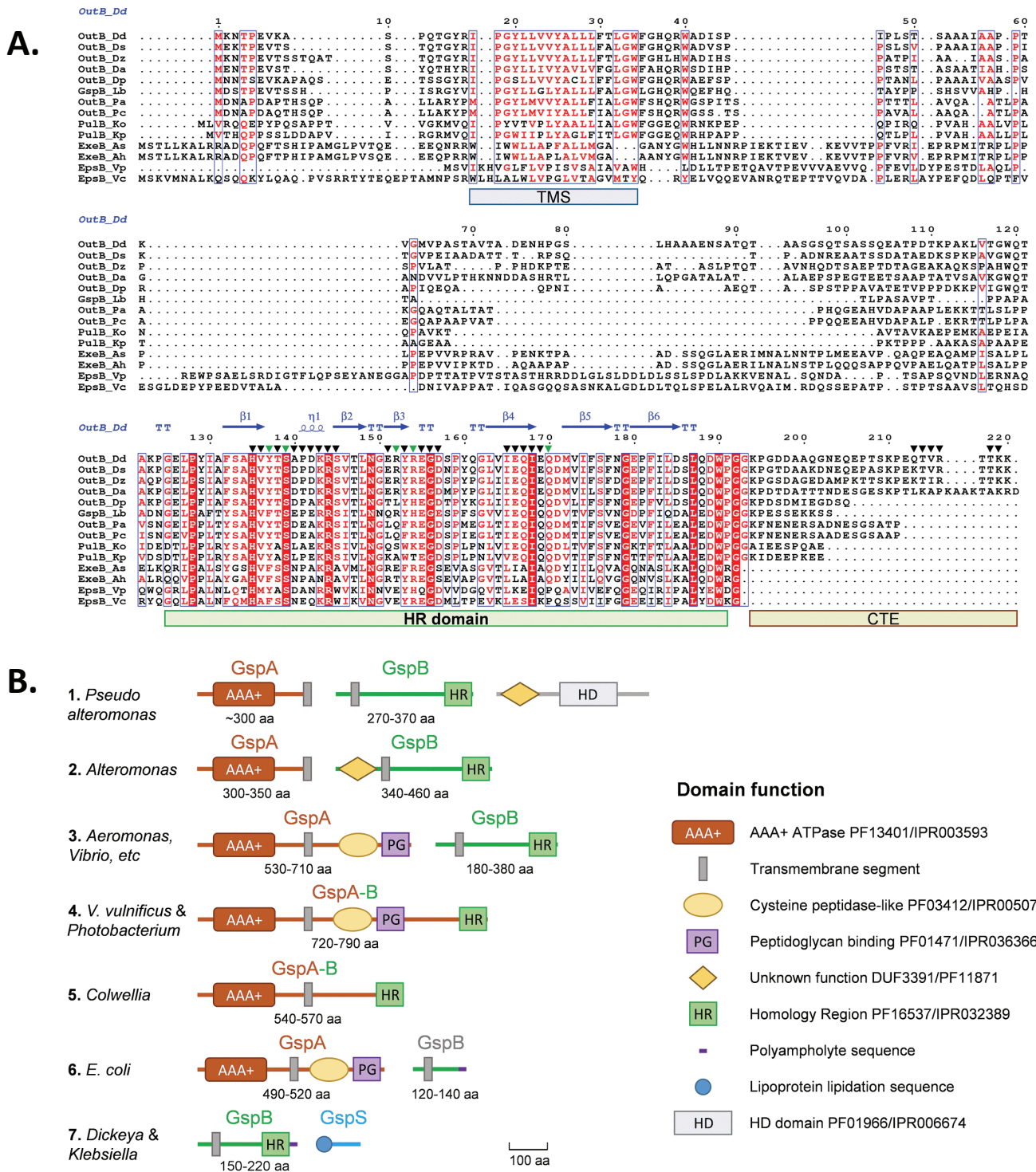


Figure 28. A. Alignement des protéines GspB de *Dickeya*, *Pectobacterium*, *Aeromonas*, *Klebsiella* et *Vibrio*. Les éléments de la structure secondaire du domaine HR d'OutB (PDB ID 4WFW) sont indiqués en bleu. La numérotation des résidus est celle d'OutB de *D. dadantii*. Les groupes de résidus identiques et similaires sont indiqués par un surlignage rouge ou une police de caractères rouge, respectivement. Les positions du segment transmembranaire (TMS), de la région d'homologie (HR) et de l'extension C-terminale (CTE) d'OutB sont indiquées par des barres colorées. La CTE n'est présente que chez *Dickeya*, *Pectobacterium* et *Klebsiella*. **B. Organisation en domaines de GspA, GspB et GspS chez différents groupes de bactéries.** Pour chaque représentant de GspB, la synténie des gènes et l'organisation des domaines ont été analysées à l'aide des bases de données NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), InterPro (www.ebi.ac.uk/interpro) et Pfam (pfam.xfam.org) et résumées en sept archétypes, nommés en fonction de la bactérie représentative la plus abondante ou la plus étudiée. La taille des protéines (en acides aminés) est indiquée pour chaque groupe. Plus de 80 % des protéines GspB analysées appartiennent à l'archétype 3. *Dickeya* et *Pectobacterium* ne possèdent pas de composant GspA, mais portent la pilotine GspS. D'après Zhang *et al.* 2022.

le périplasme. Il est composé du domaine-C (la structure cœur), constituée d'un ensemble de 60 feuillets- β internes et 60 feuillets- β externes, et de la région N-terminale d'OutD (Fig. 26.B). Cette dernière est composée de quatre domaines périplasmiques : N3, N2 et N1 appelés RBM (ring-builing motif) et d'un domaine N0. Le domaine N0 forme le premier obstacle à l'entrée du canal de la sécrétine, et il est également responsable du recrutement des substrats (Korotkov *et al.* 2009; Pineau *et al.* 2014). D'une manière intéressante, la sécrétine LspD de *L. pneumophila* possède un domaine supplémentaire de liaison non-covalent au PG de type SPOR situé juste avant le domaine N0 (Ghosal *et al.* 2019) (Fig. 27). De même, la sécrétine PilQ du système de pili de type IV (T4P) de *Myxococcus xanthus* porte en extrémité N-terminale deux domaines AMIN de liaison au PG (PGBD) (Ghosal *et al.* 2019; Leighton *et al.* 2015) (Fig. 27.g). Ces domaines PGBD assurent la stabilisation et l'ancrage de sécrétines respectives dans les parois bactériennes. En revanche, une grande majorité des autres sécrétines connues ne portent aucun domaine de liaison au PG et leur insertion dans la couche de PG est assurée par les protéines auxiliaires, comme GspA et GspB.

c. T2SS et PG : le complexe GspA/B impliqué dans le remodelage local du PG ?

Le T2SS traverse l'enveloppe entière de la bactérie, y compris la couche de PG. Or, la taille des pores du PG est considérée comme trop petite pour permettre l'assemblage des machineries telles que les T2SS, ou les flagelles (Morè *et al.* 2019). C'est pourquoi, le PG est généralement remodelé par des glucosaminidases pour permettre l'insertion de machineries multiprotéiques à travers l'enveloppe (Herlihey *et al.* 2014; Morè *et al.* 2019). Vanderline et ses collaborateurs ont exploré la possibilité que la couche de PG soit impliquée dans la mise en place de la sécrétine ExeD du T2SS chez *Aeromonas hydrophila*. Les auteurs ont observé que la multimérisation d'ExeD, formant le pore à la ME, nécessitait la présence du complexe ExeAB à la MI (Vanderlinde *et al.* 2017). En effet, l'interaction d'ExeA avec le PG, par son domaine PGBD (PF01471), induit sa propre multimérisation (Li 2010). La multimérisation d'ExeA génère une plateforme d'assemblage pour la sécrétine. La protéine ExeB, quant à elle, interagit à la fois avec ExeA et avec la sécrétine ExeD et joue un rôle de protéine d'échafaudage facilitant la mise en place de la sécrétine (Vanderlinde *et al.* 2017). Toutefois, en utilisant des approches génétiques et biochimiques, les auteurs ont montré que l'assemblage de la sécrétine ne nécessitait plus la présence d'ExeA lorsque le PG était modifié. Premièrement, la présence d'ExeA n'était plus obligatoire dans des conditions de surexpression de la D,D-carboxypeptidase PBP5, ce qui suggère que la modification du degré de réticulation du PG est importante pour la mise en place de la sécrétine (Vanderlinde *et al.* 2017). Dans une deuxième approche, *A. hydrophila* a été mise à croître dans un milieu contenant un excès de glycine. En effet, les études précédentes chez *B. subtilis* et *E. coli* ont démontré que les concentrations élevées de glycine ou de D-méthionine, entraînaient respectivement le remplacement du D-Ala en position 4 ou 5 du peptide-tige et des diminutions de la réticulation du PG de 18 % (avec Gly) et 25 % (avec D-Met) (Caparrós *et al.* 1992; Hammes *et al.* 1973). Chez *A. hydrophila*, Vanderline et ses collaborateurs ont effectivement constaté que la croissance en présence de 270 mM de glycine entraînait une incorporation significative de glycine en position 4 du peptide-tige et que la réticulation du PG a été réduite de 17 à 27 % (Vanderlinde *et al.* 2017). Les auteurs proposent que l'incorporation de glycine ou de D-Met à la place de D-Ala dans le PG d'*A. hydrophila* pourrait empêcher sa réticulation

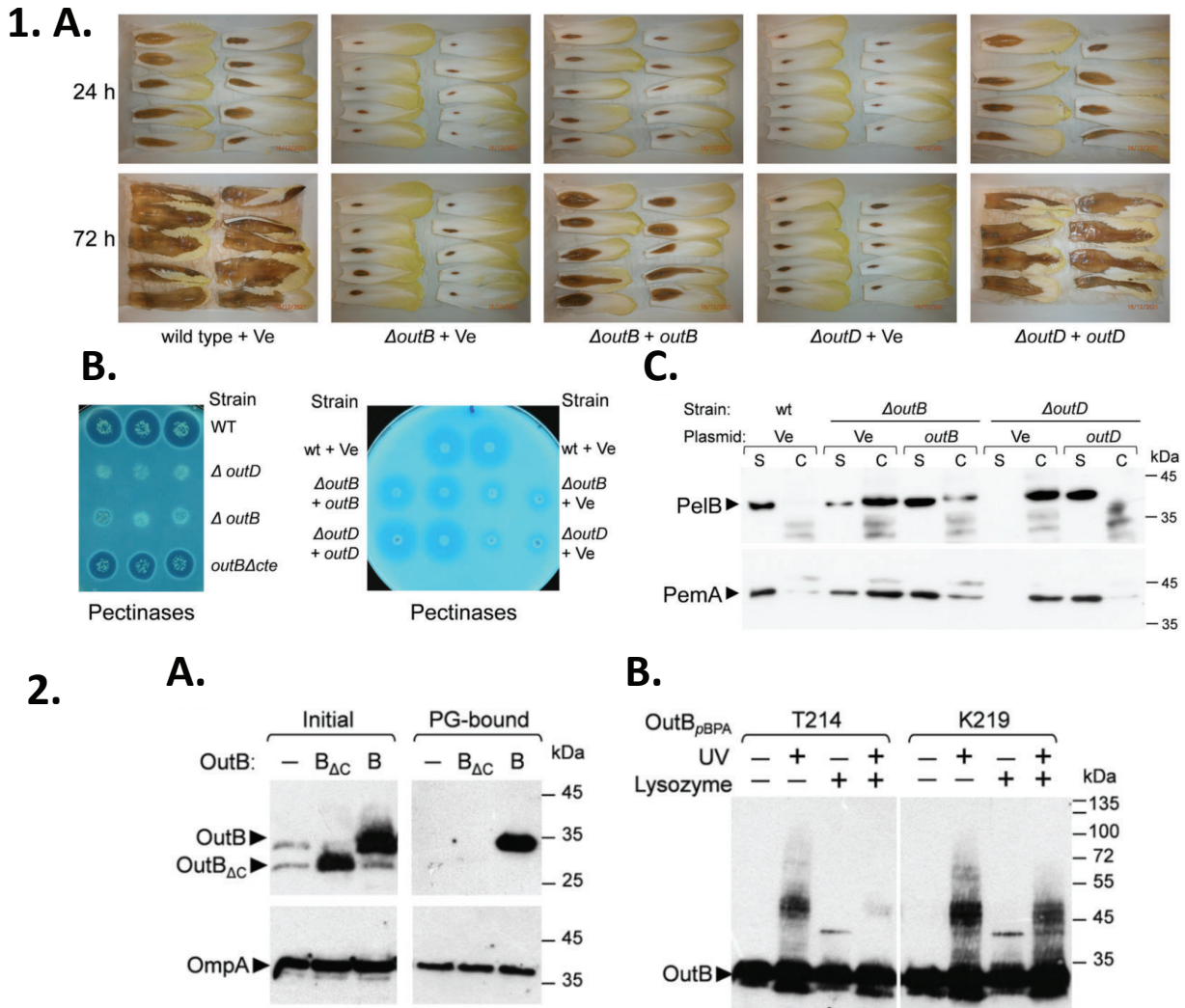


Figure 29. 1. OutB est requise pour la virulence de *D. dadantii*. **A.** Tests de pathogénicité réalisés sur feuilles d'endive inoculées avec 10^7 cellules de la souche sauvage de *D. dadantii*, de mutant *outB* ou de mutant *outD*, portant soit un vecteur pGEM-T vide (Ve), soit un plasmide exprimant le gène *outB*, ou *outD*. Les feuilles d'endives ont été incubées à 28°C pendant le temps indiqué. Les feuilles infectées avec la souche sauvage sont nécrosées au bout de 72 h, tandis que la zone d'infection est circonscrite chez les feuilles infectées par le mutant *outB* ou *outD*. **B.** Les mêmes souches de *D. dadantii* ont été cultivées pendant 14 h à 30°C sur des boîtes de pétri contenant un milieu avec polygalacturonate, un dérivé de la pectine, puis ont été recouvertes d'acétate de cuivre. La taille des halos reflète le niveau de sécrétion des pectinases. Les mutants *outB* et *outD* ne sécrètent pas de pectinases dans le milieu extérieur. **C.** Les souches de *D. dadantii* portant les mêmes plasmides que dans les panneaux A et B ont été cultivées pendant 14 h à 28°C en milieu LB liquide additionné de galacturonate. Les surnageants de culture (S) et les cellules (C) ont ensuite été séparés sur gel SDS-PAGE et ont été analysés avec des anticorps dirigés contre la pectate lyase (PelB) et la pectine méthylestérase (PemA). Dans les mutants *outB* et *outD*, les pectinases sont produites (C), mais ne sont pas sécrétées (S). Les défauts de virulence et de sécrétion observés chez les souches *outB* et *outD* ont été efficacement complétés par les plasmides exprimant soit le gène *outB* soit le gène *outD*. **2. OutB interagit avec le PG.** **A.** Pontage chimique *in vivo* avec le DTSSP. Le mutant *outB* de *D. dadantii* portant soit un vecteur vide, soit un plasmide exprimant le gène *outB* ou OutB délété de l'extension C-terminale (OutB $\Delta Acte$), ont été traités avec le DTSSP. Le PG a ensuite été extrait par une procédure d'ébullition au SDS, et les protéines liées au PG ont été éluées avec du β -mercaptoéthanol, et analysées par western blot avec les anticorps anti-OutB ou anti-OmpA. Seule OutB est éluée du PG, alors que OutB $\Delta Acte$ ne l'est pas, ce qui suggère que la CTE interagit avec le PG. **B.** Pontage aux UVs site-spécifique *in vivo*. Les substitutions OutB $_{pBPA}$ (T214 et K219) ont été exprimées chez le mutant *outB* de *D. dadantii*. Les cellules ont été exposées aux UVs, traitées ou non avec du lysozyme, puis ont été analysées par western blot avec l'anticorps anti-OutB. Des complexes de haut poids moléculaire réagissant avec les anticorps anti-OutB sont visibles lors de l'exposition aux UVs, mais disparaissent lors du traitement au lysozyme. Ce résultat suggère que ces complexes sont composés de PG, et suppose donc que la CTE interagit avec celui-ci. D'après Zhang *et al.* 2022.

par plusieurs mécanismes : i) soit par l'inhibition des PBPs de HMW (voir le chapitre 'PBPs'), réduisant la quantité de peptides-tiges réticulés, soit ii) du fait que les peptides-tiges portant une glycine terminale constituent de mauvais substrats pour les transpeptidases (Caparrós *et al.* 1992; Hammes *et al.* 1973). Néanmoins, il faut noter que la quantité de sécrétine assemblée dans la ME en l'absence d'ExeAB dans des conditions de modification chimique du PG est plus faible que celle observée chez la souche sauvage.

Selon les auteurs, ces résultats prouvent que la fonction principale d'ExeA est de modifier la taille des pores du PG pour permettre le transport d'ExeD à travers la ME. Ainsi, le complexe ExeAB serait impliqué dans la réorganisation du PG, ainsi que dans la localisation de la sécrétine à une zone précise du PG. Toutefois, le mécanisme moléculaire de cette modification reste inconnu.

d. Représentation de GspA et GspB chez les protéobactéries

Une étude phylogénétique récente a montré la présence d'homologues de GspA et de GspB dans plusieurs groupes de γ -protéobactéries et de β -protéobactéries (Zhang *et al.* 2022) (Fig. 28). GspA est une protéine à plusieurs domaines, dont la composition varie selon les bactéries. Par exemple, chez *Vibrio* et *Aeromonas*, GspA possède un domaine cytoplasmique ATPase fusionné, du côté C-terminal, à un segment transmembranaire, suivi d'une grande région périplasmique avec un domaine de type peptidase à cystéine, et un domaine de liaison au PG (Fig. 28.B). Toutes les GspB portent un segment transmembranaire unique et un domaine HR (homology region) périplasmique, mais leur longueur et leur composition varient considérablement selon les bactéries (Zhang *et al.* 2022). Par ailleurs, chez la plupart des bactéries, les gènes *gspA* et *gspB* sont co-localisés et co-exprimés. Cependant, certaines bactéries comme les *Dickeya* ne possèdent pas le composant GspA, mais possèdent seulement GspB (Fig. 28.B). La partie suivante illustre la diversité des composants GspA/B chez les bactéries, et met en lumière le rôle de GspB chez *D. dadantii*.

Chez *Alteromonas* et *Pseudoalteromonas*, les GspA sont dépourvus de région périplasmique et les GspB respectives sont nettement plus longs que chez la plupart des autres bactéries (Fig. 2B). En outre, les GspB d'*Alteromonas* possèdent un domaine cytoplasmique supplémentaire de la famille DUF3391. Chez *Aeromonas* et *Vibrio*, GspA porte un domaine spécialisé de liaison au PG (Fig. 28.B) et, comme présenté plus haut, le complexe GspA/GspB est impliqué dans l'insertion de la sécrétine dans le PG (Li et Howard 2010). Chez *Vibrio vulnificus*, GspA est fusionnée à la partie périplasmique de GspB en un seul polypeptide GspAB (Martynowski *et al.* 2013). Des fusions GspAB similaires, de longueur et de composition en domaines variées, semblent être apparues indépendamment dans plusieurs groupes de γ -protéobactéries (Fig. 28.B). Ce phénomène favorise l'hypothèse d'une relation fonctionnelle étroite entre GspA et GspB. Chez *E. coli* K-12 et quelques autres entérobactéries étroitement apparentées, une GspA multidomaine (ATPase, peptidase, PGBD) est associée à une GspB remarquablement petite, dépourvue de domaine HR, mais possédant une séquence polyampholyte (alternance de résidus chargés positivement et négativement (Fig. 28.B). Enfin, *Dickeya*, *Pectobacterium*, *Klebsiella* et quelques autres bactéries proches n'ont pas d'homologue GspA. En revanche, chez ces bactéries, GspB possède une séquence polyampholyte C-terminale qui rappelle

celles de certains domaines de lectines liant les sucres. Cette séquence est située juste après le domaine HR, et est associée à une protéine de la famille des pilotines OutS/PuS. Par conséquent, selon la bactérie, les protéines GspB varient considérablement en longueur et en composition de domaines. Enfin, les GspB agissent de concert avec un GspA ou avec une pilotine GspS (Zhang *et al.* 2022).

Chez *D. dadantii*, la protéine OutB est importante pour la fonction du T2SS, puisque la délétion du gène *gspB* impacte l'assemblage de la sécrétine et cause une baisse de la virulence, ainsi que la diminution de la sécrétion de pectinases (Zhang *et al.* 2022) (Fig. 29.1.A et 29.1.B). Dans un mutant *outB* de *D. dadantii*, la propagation des symptômes liés à l'infection est circonscrite par rapport à la souche sauvage (Zhang *et al.* 2022) (Fig. 29.1.B). Par ailleurs, une étude antérieure a montré, que la surproduction d'OutD dans un mutant *outB* permettait de surmonter les défauts de sécrétion par le T2SS (Condemine *et Shevchik* 2000). Ceci peut indiquer que la sécrétine OutD est une cible principale d'OutB. Or, chez *D. dadantii*, la lipoprotéine OutS joue un rôle crucial dans la mise en place de la sécrétine OutD à la ME (Shevchik *et Condemine* 1998). En effet, dans un mutant *outs*, la protéine OutD est mal localisée, et s'accumule à la MI ce qui déclenche une fuite d'ions du cytoplasme, et déclenche la réponse Psp (Shevchik *et Condemine* 1998). Plus récemment, Zhang *et ses collaborateurs* ont observé que la surexpression d'OutB diminuait la réponse Psp, suggérant qu'une abondance d'OutB pouvait aider à la mise en place de la sécrétine dans la ME (Zhang *et al.* 2022). Des études plus approfondies ont montré que la région périplasmique d'OutB suffisait à diminuer la réponse Psp. En effet, l'expression d'OutB possédant une séquence signal clivable à la place de la région transmembranaire a généré une protéine OutB soluble qui se lie suffisamment fortement à la sécrétine pour l'acheminer correctement à la ME (Zhang *et al.* 2022). Cette interaction a lieu entre le domaine HR d'OutB et le domaine N0 de la sécrétine OutD (Gu *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2022) (Fig. 26.B). La structure du domaine HR d'OutB est similaire à celle d'OutC. Elle est composée de deux feuillets- β antiparallèles à trois brins (Gu *et al.* 2012). Ces feuillets- β s'assemblent pour former un sandwich- β interagissant avec le domaine N0 de GspD (Gu *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2022). Ainsi, la protéine d'échafaudage OutB, en concert avec la pilotine OutS, facilite l'assemblage du T2SS de *D. dadantii* en ancrant la sécrétine à la MI et au PG (Zhang *et al.* 2022).

e. OutB de *D. dadantii* est une protéine d'échafaudage facilitant la mise en place de la sécrétine, et interagissant avec le PG

Chez *D. dadantii*, OutB est une protéine de 220 acides aminés ayant un poids moléculaire de 23,5 kDa. OutB possède une courte région cytoplasmique, suivie d'une hélice transmembranaire, et dans la partie périplasmique, une région linker, un domaine HR qui interagit avec le domaine N0 de la sécrétine OutD, et enfin, une extension C-terminale (CTE) de 28 résidus spécifique aux bactéries du genre *Dickeya*. En effet, les *Pectobacterium* et *Klebsiella* possèdent également une CTE, mais celle-ci est plus courte (~15 résidus). Afin d'analyser le rôle de la CTE de *D. dadantii*, Zhang *et ses collègues* ont tout d'abord évalué son implication dans la sécrétion des pectinases. Même si la délétion de la CTE a provoqué une certaine diminution de la sécrétion, cet effet n'était pas aussi important que la délétion complète d'OutB (Zhang *et al.* 2022). Zhang *et ses collaborateurs* ont ensuite cherché à savoir si l'absence de GspA chez *D. dadantii* pouvait être compensée en partie par l'extension C-terminale

d'OutB. En effet, la séparation des composants d'enveloppe de *D. dadantii* sur gradient de sucrose a montré qu'OutB était présent à la fois dans la fraction correspondant à la ME et à la MI. Toutefois, le traitement de l'enveloppe par le lysozyme a modifié la localisation d'OutB, qui était alors uniquement retrouvée dans la MI (Zhang *et al.* 2022). Ces résultats suggèrent qu'OutB interagit avec le PG. Comme OutB ne possède aucun domaine connu de liaison au PG, les auteurs ont proposé que l'interaction d'OutB avec le PG pourrait s'établir via son extrémité C-terminale de 28 résidus (Zhang *et al.* 2022) (Fig. 29.2). Pour démontrer cela, les interactions entre OutB et le PG ont été évaluées *in vivo* par deux approches complémentaires. Premièrement, le pontage avec 3,3'-dithio-bis(sulfosuccinimidyl)propionate (DTSSP), a démontré que la CTE d'OutB était spatialement proche du PG et que les deux pourraient interagir. En effet, le DTSSP est un agent bifonctionnel portant de chaque côté un groupement sulfo-NHS réagissant aux amines primaires, comme ceux dans la chaîne latérale de la lysine. Un bras espaceur de huit carbones entre les deux groupes sulfo-NHS permet un couplage covalent à une distance maximale de 12 Å. Dans une deuxième approche, les auteurs ont eu recours au pontage aux UVs spécifique de site avec l'acide aminé photo-réactif pBPA (p-benzoyl-l-phenylalanine). Une fois que le résidu d'intérêt est substitué *in vivo* par pBPA, une courte exposition des cellules aux UV (3 min) permet de coupler pBPA à des résidus très proches, situés à une distance maximale de 3 Å. Pour cela, des substitutions au pBPA ont été introduites dans quelques résidus ciblés de la CTE d'OutB (T214 et K219) et l'interaction de ces résidus avec le PG a été évaluée chez *D. dadantii*. Le traitement des cellules aux UVs a provoqué la formation de quelques adduits, réactifs aux anticorps anti-OutB et sensibles au traitement des cellules par le lysozyme (Fig. 29.2). Ces expériences ont donc démontré que la protéine OutB, et plus précisément son extrémité C-terminale, interagissait avec le PG (Zhang *et al.* 2022). La nature d'une telle interaction reste néanmoins à découvrir.

Objectifs de la thèse

L'objectif principal de cette thèse est de déchiffrer la nature de l'interaction entre OutB et le PG observée par Zhang et ses collaborateurs (Zhang *et al.* 2022), et de déchiffrer les mécanismes moléculaires de ce phénomène et les enzymes impliquées.

Les larges machineries cellulaires comme les systèmes de sécrétion, les pili ou les flagelles traversent l'enveloppe des bactéries à Gram négatif. L'ancrage de ces gros complexes multiprotéiques à la paroi est le plus souvent assuré par des domaines protéiques spécialisés, liés de manière non covalente au PG (Aschtgen, Gavioli, *et al.* 2010; Ghosal *et al.* 2019). La γ -protéobactérie phytopathogène *Dickeya dadantii* utilise le système de sécrétion de type 2 (T2SS) pour sécréter un arsenal d'enzymes pectinolytiques. La protéine OutB est un composant du T2SS et son domaine HR interagit avec le domaine NO de la sécrétine OutD, qui se situe à proximité de la couche de PG. Dans une étude récente, Zhang a montré qu'OutB interagissait avec le PG par un mécanisme inconnu (Zhang *et al.* 2022).

Le premier objectif de ces travaux de recherche a consisté à identifier la région d'OutB permettant son interaction avec le PG. Nous avons par la suite recherché un couplage covalent potentiel entre les résidus d'OutB et le PG de *D. dadantii*.

Le deuxième objectif de ces travaux était d'identifier d'autres protéines attachées de manière covalente au PG chez *D. dadantii*, et plus largement, chez les γ -protéobactéries. Pour les identifier, nous avons cherché à savoir s'il existait un motif protéique ubiquitaire permettant le couplage de protéines au PG. Pour déterminer un tel motif, nous avons réalisé la mutagenèse dirigée des six résidus C-terminaux de Lpp, seule protéine connue pour être liée au PG chez *E. coli* (Magnet *et al.* 2007), et évalué le couplage de cette dernière au PG. Selon notre hypothèse de départ, ce motif consensus serait reconnu par les L,D-transpeptidases (Ldts) catalysant le couplage de protéines au PG, et la découverte d'un tel motif permettrait d'identifier *in silico* de nombreuses autres protéines potentiellement liées au PG chez *D. dadantii*.

Le troisième objectif de cette thèse était d'identifier et de caractériser les Ldts impliquées dans le couplage covalent de Lpp au PG chez *D. dadantii*. Par ailleurs, nous avons souhaité évaluer l'activité croisée des Ldts d'*E. coli* chez *D. dadantii*. Cet axe de recherche a pour ambition de mettre en lumière i) la spécificité enzymatique des Ldts, ii) de déterminer leurs conditions d'expression, et iii) de comprendre les raisons de la multiplicité des gènes de *ldt* chez les protéobactéries.

Tableau 3. Souches utilisées dans ce travail.

Souche	Génotype
<i>E.coli</i> NM522	$\Delta(lac-proAB)$, <i>thi</i> , <i>hsd5</i> , <i>supE</i> , [<i>F'</i> <i>proAB+</i> , <i>lacI</i> , <i>lacZ</i> Δ M15
<i>D. dadantii</i> A5652	souche sauvage
<i>D. dadantii</i> A6298	<i>lpp::cat</i> (Cm ^R)
<i>D. dadantii</i> A6610	<i>ldt03::tetA</i> (Tet ^R)
<i>D. dadantii</i> A6260	<i>ldt84::aadA</i> (Sm ^R)
<i>D. dadantii</i> A6261	<i>ldt70::cat</i> (Cm ^R)
<i>D. dadantii</i> A6621	<i>ldt03::tetA</i> , <i>ldt84::aadA</i> (Tet ^R , Sm ^R)
<i>D. dadantii</i> A6264	<i>ldt70::cat</i> , <i>ldt84::aadA</i> (Cm ^R , Sm ^R)
<i>D. dadantii</i> A6266	<i>ldt03::tetA</i> , <i>ldt70::cat</i> , <i>ldt84::aadA</i> (Tet ^R , Cm ^R , Sm ^R)
<i>D. dadantii</i> A6268	<i>ldt03::tetA</i> , <i>ldt70::cat</i> (Tet ^R , Cm ^R)
<i>D. dadantii</i> A6296	<i>ldt523::aacC1</i> (Gm ^R)
<i>D. dadantii</i> A6336	<i>ldt03::tetA</i> , <i>ldt523::aacC</i> (Tet ^R , Gm ^R)
<i>D. dadantii</i> A6303	<i>ldt84::aadA</i> , <i>ldt523::aacC</i> (Sm ^R , Gm ^R)
<i>D. dadantii</i> A6304	<i>ldt70::cat</i> , <i>ldt523::aacC1</i> (Cm ^R , Gm ^R)
<i>D. dadantii</i> A6637	<i>ldt03::tetA</i> , <i>ldt84::aadA</i> , <i>ldt523::aacC1</i> (Tet ^R , Sm ^R , Cm ^R)
<i>D. dadantii</i> A6633	<i>ldt03::tetA</i> , <i>ldt84::aadA</i> , <i>lpp::cat</i> (Tet ^R , Sm ^R , Cm ^R)

Tableau 4. Oligonucléotides utilisés pour l'amplification des gènes *ldt* chez *D. dadantii* et *E. coli*.

For_Ldt03	GTACCGGATAACAACAATTCC
Rev_Ldt03	GCAGCGTAAGCTGCCCTGTG
For_Ldt70	CGCGATGTGATAAAAGCAGTG
Rev_Ldt70	GCCCGTCGATGCAACCCGAG
For_Ldt84	GTAACCCTGTGTTGCGCTCTG
Rev_Ldt84	GATGTCAGAACGCCCGCTGATG
LdtA	GAATTCGCTATACTTAAC GGATAGC
RLdtA	AAGCTTTCTAATTACCAA CGC
LdtB	GAATTCCAATACTCTAATATTCTC
RLdtB	AAGCTTATGAGTCCGCCTTTTGCTT
LdtC	GAATTCAGGCTTATCTGTTTATTAC
RLdtC	AAGCTTCCCCGCGACATGCCGTGTCG
LdtE	GAATTCGACGTTTCAGCGTGAGTC
RLdtE	AAGCTTGTCTGCCGTTTACCGCTAC

Tableau 5. Oligonucléotides utilisés pour la construction des versions d'OutB.

Rev_OutBT218Y	GCAGTTGCTGTGTCATTTCTTGATGTCCTGACGGTTTGCTCCCCG
OuB_K220tga	GAAGTGATGACACAGCAACTGCACATC
ROuB_K220tga	GTCATCACTTCGTTGTCCTGACGGTTTG
OuBdlt29B	GCCGATATCGCGGATGAAAACCATCCTG
ROuBdlt29B	TTTCATCCGCGATATCGGCCAGCGTTGAT
OuBStrp2	GGCATGGAGCCACCCGAGTTTCGAAAAGCCTCACAGGAGGCGACGCCAG
ROuBStrp2	GAGGCTTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCATGCCGTCTGAGTTGCGCTGTT

Matériel et méthodes

Souches bactériennes et conditions de culture. Les bactéries (référencées Tableau 3) ont été cultivées dans le milieu riche Luria-Bertani (LB) à 30°C sous agitation. Si nécessaire, le milieu a été solidifié avec 15 g.L⁻¹ d'agar et les antibiotiques ont été ajoutés aux concentrations suivantes : ampicilline, 100 µg/mL ; kanamycine 50 µg/mL ; chloramphénicol 20 µg/mL. L'IPTG a été ajouté à une concentration finale de 1mM pour induire l'expression des gènes d'intérêt clonés sur le plasmide sous contrôle du promoteur *Plac*. L'arabinose à 0,1 % a été ajoutée pour induire l'expression des gènes d'intérêt clonés sur le plasmide sous contrôle du promoteur PBAD.

Test de sensibilité au SDS par dilution. Les bactéries ont été cultivées en BL additionné d'antibiotiques appropriés jusqu'à DO₆₀₀ 1,0 et des dilutions au dixième jusqu'à la dilution 10⁻⁶ ont été réalisées. 3 µL de chaque dilution ont été déposés sur milieu LB-agar contenant soit l'inducteur (IPTG 1 mM). Lorsqu'indiqué, le SDS a été ajouté à une concentration de 0,05 % ou 0,1 %. Les boîtes ont ensuite été incubées à 30°C et la croissance des bactéries a été observée pendant 12 à 72 h.

Test de sécrétion de pectinases Les bactéries ont été cultivées en BL additionné d'antibiotiques appropriés jusqu'à DO₆₀₀ 1,0. 3 µL de suspension bactérienne a été déposée sur milieu LB-agar contenant du polygalacturonate (PGA 0,2%) et du glycérol (0,2%). Après 15h de croissance à 30°C, les boîtes ont été recouvertes par une solution aqueuse saturée d'acétate de cuivre, afin de révéler les halos de digestion du polygalacturonate.

Méthodes de biologie moléculaire.

L'extraction d'ADN plasmidique par lyse alcaline, les digestions d'ADN plasmidique et l'électrophorèse sur gel d'agarose ont été effectuées selon Sambrook and Russell (2001). Les extractions d'ADN plasmidique ou sur gel ont été réalisées avec les kits Nucleospin Plasmid et Nucleospin Gel and PCR clean-up (Machery-Nagel). La quantification de l'ADN purifié a été réalisée par une mesure au NanoDrop. L'amplification de gènes *ldt* et *lpp* a été réalisée avec les billes Ready-To-Go (GE Healthcare). La mutagenèse dirigée par PCR a été réalisée avec le kit PrimeSTAR Max DNA Polymerase (TaKaRa). La vérification du génotype des souches a été réalisée avec les billes Ready-To-Go (GE Healthcare). Les transformations avec l'ADN plasmidique ont été réalisées par électroporation chez *D. dadantii* et par choc thermique chez *E. coli* sur des cellules rendues compétentes après un traitement au CaCl₂.

Production des versions d'OutB, de Lpp, de Lpp:OutB, de PaeX et des fusions Bla-OutB. Les plasmides utilisés dans les expériences sont référencés Tableau 9. Les différentes versions d'OutB ont été générées par mutagenèse dirigée (amorces Tableau 5) et leur séquence a été vérifiée (Eurofins, MicroSynth). Les versions Lpp:OutB ont été construites à partir des gènes *lpp* et *outB* de *D. dadantii* (amorces Tableau 5 et 6) et ont été clonés dans le pGEM-T. Les gènes *paeX*, *ldt03*, *ldt84*, *ldt70* et *ldt523* ont été amplifiés à partir de l'ADN chromosomique de *D. dadantii* (amorces Tableau 4 et 8), clonés dans pGEM-T, puis dans pBluescript et pBAD-18. Les gènes *ldtA*, *ldtB*, *ldtC* et *ldtE* ont été amplifiés à partir de l'ADN chromosomique d'*E. coli* (amorces Tableau 4), puis ont été clônés dans le pGEM-T ou le pBluescript. Les différentes versions et de PaeX ont été générées par mutagenèse dirigée (amorces

Tableau 6. Oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse dirigée du motif C-terminal de Lpp.

Nom	Séquence
For_Lpp	CGTAGTGGTGATGGTTTCCG
Rev_Lpp	CGCAATCGGCATGGTCTGC
Lpp_dlt58_Y56T	GTACTIONACCAAGTAGTAAGAAGTGGTTGAATG
RLpp_dlt58_Y56T	CTTGGTAGTACGAACCTGGTTGTCCAGG
Lpp_dlt58_K57R	TACAGGTAGTAAGAAGTGGTTGAATG
RLpp_dlt58_K57R	CTACCTGTAAGTACGAACCTGGTTG
Lpp_dlt58_K57R_Y56T	GTACTIONACCAGGTAGTAAGAAGTGGTTGAATG
RLpp_dlt58_K57R_Y56T	CTACCTGGTAGTACGAACCTGGTTGTCCAG
Lpp-B#12	GACGCTCTGGCTACCGACGTCGATGACGCCGCGCAAGAC
RLpp-B#12	GTCTTGCGCGGCATCGACGTCGGTAGCCAGAGCGTC
Lpp_twnStrp2	CAGCTGGTCCCATCCCCAATTTGAGGCTTCTGGAGCCACCCCCAGTTCCG
RLpp_twnStrp2	TCCAGGAAGCCTCAAATTTGGGGATGGGACCAGCTGGAGCAACCAGCCAGC
LppY56T_K57Y	GGACAACCAGGTTCTGTACTIONACTATGAAGTAAGAAGTGGTTGAATG
RLppY56T_K57Y	CATTCAACCAGTTCTTACTTCATAGTAGTACGAACCTGGTTGTCC
LppT55K	CCTGGACAACCAGGTTCTGTAATAACAAGAAGTAAGAAGTGG
RLppT55K	CCAGTTCTTACTTCTTGTATTTACGAACCTGGTTGTCCAGG
LppK57R	CAACCAGGTTCTGTACTIONTACAGGAAGTAAGAAGTGGTTGAATG
RLppK57R	CATTCAACCAGTTCTTACTTCTGTAAGTACGAACCTGGTTG
LppR54T	GCGCCTGGACAACCAGGTTACTACTTACAAGAAGTAAGAAGTGG
RLppR54T	CCAGTTCTTACTTCTTGTAAAGTAGTAACCTGGTTGTCCAGGCCG
LppY56T	CCTGGACAACCAGGTTCTGTACTIONACCAAGAAGTAAGAAGTGGTTG
RLppY56T	CAACCAGTTCTTACTTCTTGGTAGTACGAACCTGGTTGTCCAGG
LppV53A	CCAGCGCCTGGACAACCAGGCTCGTACTIONTACAAGAAGTAAG
RLppV53A	CTTACTTCTTGTAAAGTACGAGCCTGGTTGTCCAGGCCGCTGG

Tableau 7. Oligonucléotides utilisés pour la construction de la fusion BlaM-OutB.

BladltB	GACGGTTTGGGTTTCCCGCCTGGCCAAATG
RBladltB	GGGAAACCGCAAACCGTCAGGACAACGAAG

Tableau 8. Oligonucléotides utilisés lors de la mutagenèse de PaeX.

ForPaeX_RI	GAATTCAAACGGGTAAACTGTCATG
RevPaeX_HIII	TAAGCTTGGGCTGCAGGTCGAC
PaeX_K322T	GGCGAATCAACCGGATAAAACATAAC
RPaeX_K322T	GTGACGGTGTAAGTATGTTTTA
PaeX_K321tga	ATACGGCGAATCAACCGGATTGAAAAT
RPaeX_K321tga	GACGGTGTAAGTATTTTTCAATCC
PaeX_K313A	CTAACATCGCTGCCGTTAAAGGCAAATA
RPaeX_K313A	CCGTTGATTGCGCGTATTTGCCTTTA
PaeX_K312Y	CTGGCTAACATCGCTGCCGTTATACAAAA
RPaeX_K312Y	CCGTTGATTGCGCGTATTTTTGTATAAC
PaeX_K312-313A	GGCTAACATCGCTGCCGTTAGCGGCAA
RPaeX_K312-313A	GGTTGATTGCGCGTATTTGCCGTAAC
PaeX_K312tga	GGCTAACATCGCTGCCGTTATGAAAAA
RPaeX_K312tga	CGGTTGATTGCGCGTATTTTTTACATAAC

Tableau 8) et leur séquence a été vérifiée (Eurofins, MicroSynth). Les versions de Bla-OutB ont été générées par mutagenèse dirigée (amorces Tableau 7).

Tableau 8) et leur séquence a été vérifiée (Eurofins, MicroSynth). Les versions de Bla-OutB ont été générées par mutagenèse dirigée (amorces Tableau 7).

Construction des souches de *D. dadantii* mutantes (*lpp* et *ldt*). Pour la construction d'une souche *lpp*⁻, un fragment d'ADN contenant le gène *lpp* avec une région de 200 pb en amont et 500 pb en aval a été amplifiée par PCR en utilisant les amorces Lpp_For et Lpp_Rev (Tableau 6). Le produit PCR a ensuite été cloné dans le plasmide pGEM-T et un gène de résistance au chloramphénicol *cat* (codant pour l'acétyltransférase du chloramphénicol) a été inséré dans le gène *lpp* en utilisant le site *HpaI*. Le plasmide ainsi obtenu a été introduit par électroporation dans la souche sauvage de *D. dadantii* et la construction *lpp::cat* a été recombinaison sur le chromosome à la place de l'allèle *lpp* sauvage par la recombinaison homologue. En pratique, à la suite des cultures successives dans le milieu bas phosphate facilitant la recombinaison, les bactéries ont été étalées sur les boîtes BL. Les colonies ont ensuite été répliquées sur les boîtes contenant soit du chloramphénicol, soit de l'ampicilline afin de sélectionner les colonies Cm^R et Amp^S ayant recombinaison le gène muté *lpp::cat* mais perdu le plasmide pGEM-T. Les colonies mutées ainsi sélectionnées ont ensuite été vérifiées par PCR et par Western blot. Pour éviter la présence de mutations secondaires apparues lors de recombinaison, la mutation *lpp::cat* a été transmise *de novo* dans la souche sauvage. Les souches mutées de gènes *ldt* ont été construites de même manière, mais en utilisant des gènes de résistance aux antibiotiques différents (voir le Tableau 3).

Purification du peptidoglycane. Les cultures de *D. dadantii* ont été ensemencées en 1/20 dans le milieu LB additionné de glycérol et d'antibiotiques, et cultivées sous agitation à 30°C. Lorsque DO₆₀₀ atteint 1,0 (~5-6 h), les cellules ont été collectées par centrifugation 5 min à 5 000 g, resuspendues dans le même volume de milieu inducteur (LB additionné d'antibiotiques, de galacturonate, d'IPTG et/ou d'arabinose), puis remises à cultiver sous agitation pendant 3 h. Les cellules ont ensuite été collectées par centrifugation 7 min à 7 000 g et congelées à -20°C. Les cellules congelées ont été reprises par 2,5 mL de tampon PBS (50 mM Na phosphate pH 7.2, 0,1 M NaCl) sur la glace, puis ajoutées goutte par goutte dans 2 mL de SDS 10% bouillant, laissé bouillir pendant 1 h. Après 24 h de repos à 20 °C, la solution a été centrifugée 2 h à 200 000 g et le culot de PG a été remis en suspension dans du SDS 2%, puis mis à bouillir pendant 1 h. Le PG a été précipité par la centrifugation, resuspendu dans le tampon TNP (tris-HCl pH 8, NP-40 0.5 %) et incubé à 60°C pendant 1 h. Cette opération de lavage (centrifugation-suspension-incubation) a été répétée 3 fois et le PG a été resuspendu dans 1 mL de TNP.

Analyse des protéines attachées au PG en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE). Les échantillons de PG purifié (50 µL) ont été digérés ou non par l'ajout de 2 µL de lysozyme (2 µg/µL), ou 1 µL de PGRP (2 µg/µL), ou 1 µL de mutanolysine (2 µg/µL) pendant 3 h à 37°C. Ils ont ensuite été additionnés de 20 µL de tampon de lyse, bouillis pendant 7 min et séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide, SDS-PAGE, soit dans un système « classique » selon Laemmly, soit « Tris-Tricine ». La migration a été effectuée à 20 mA par gel pendant 5 h et les protéines ont été visualisées dans une solution de Bleu de Coomassie R-250 0,25%, d'acide acétique 10% et d'éthanol 40%, soit transférées sur une membrane et révélées avec les anticorps appropriés.

Tableau 9. Plasmides utilisés dans ce travail.

Nom	Description
pGEM-T	Permet le clonage direct des produits PCR et la sélection par α -complémentation. Promoteurs pT7 et Plac ; Amp ^R
pGEMT_OutB_wt	pGEM-T portant le gène outB sauvage
pGEMT_OutB_T218Y	pGEM-T portant le gène outB muté, codant OutB_T218Y
pGEMT_OutB_K219tga	pGEM-T portant le gène outB muté, codant OutB_K219tga
pGEMT_OutB_K220tga	pGEM-T portant le gène outB muté, codant OutB_K220tga
pGEMT_OutB Δ 29	pGEM-T portant le gène outB muté, codant OutB_ Δ 29
pGEMT_OutB Δ 22	pGEM-T portant le gène outB muté, codant OutB_ Δ 22
pGEMT_OutB+21	pGEM-T portant le gène outB muté, codant OutB+21
pGEMT_OutB_ Δ Ct	pGEM-T portant le gène outB muté, codant OutB_ Δ Ct
pGEMT_OutB_ Δ CTE	pGEM-T portant le gène outB muté, codant OutB_ Δ CTE
pGEMT_OutB_PS	pGEM-T portant le gène outB muté, codant OutB_PS
pGEMT_PaeX	pGEM-T portant le gène PaeX
pGEMT_PaeX_K312Y;	pGEM-T portant le gène PaeX muté
pGEMT_PaeX_K313A	pGEM-T portant le gène PaeX muté
pGEMT_PaeX_K321tga	pGEM-T portant le gène PaeX muté
pGEMT_PaeX_K322tga	pGEM-T portant le gène PaeX muté
pGEMT_Lpp_wt	pGEM-T portant le gène <i>lpp</i>
pGEMT_Lpp+21	pGEM-T portant le gène <i>lpp+21</i>
pGEMT_Lpp Δ 21	pGEM-T portant le gène <i>lppΔ21</i>
pGEMT_Lpp:OutB#3	pGEM-T portant la fusion <i>lpp::outB#3</i>
pGEMT_Lpp:OutB#4	pGEM-T portant la fusion <i>lpp::outB#4</i>
pGEMT_Lpp:OutB#5	pGEM-T portant la fusion <i>lpp::outB#5</i>
pGEMT_Lpp:OutB#6	pGEM-T portant la fusion <i>lpp::outB#6</i>
pGEMT_Lpp:OutB#7	pGEM-T portant la fusion <i>lpp::outB#7</i>
pGEMT_Lpp:OutB#8	pGEM-T portant la fusion <i>lpp::outB#8</i>
pGEMT_Lpp:OutB#9	pGEM-T portant la fusion <i>lpp::outB#9</i>
pGEMT_Lpp:OutB#10	pGEM-T portant la fusion <i>lpp::outB#10</i>
pGEMT_Lpp:OutB#11	pGEM-T portant la fusion <i>lpp::outB#11</i>
pGEMT_Lpp:OutB#12	pGEM-T portant la fusion <i>lpp::outB#12</i>
pBluescript	Site multiple de clonage et le promoteur Plac inducible par l'IPTG; la sélection par α -complémentation ; Kan ^R
pBS_Ldt03	pBluescript portant le gène <i>ldt03</i>
pBS_Ldt84	pBluescript portant le gène <i>ldt84</i>
pBS_Ldt70	pBluescript portant le gène <i>ldt70</i>
pBS_Ldt523	pBluescript portant le gène <i>ldt523</i>
pBS_LdtA	pBluescript portant le gène <i>ldtA</i>
pBS_LdtB	pBluescript portant le gène <i>ldtB</i>
pBS_LdtC	pBluescript portant le gène <i>ldtC</i>
pBS_LdtE	pBluescript portant le gène <i>ldtE</i>
pBAD-33	Porte le site multiple de clonage et le promoteur PBAD inducible par arabinose ; Cm ^R
pBAD_OutBwt	pBAD portant le gène <i>outB</i>
pBAD_OutB+21	pBAD portant le gène <i>outB+21</i>
pBAD_OutB Δ 21	pBAD portant le gène <i>outBΔ21</i>

Western blot : immunodétection de protéines sur une membrane. Après la séparation sur un gel SDS-PAGE, les protéines ont été transférées sur membrane de Immobilon PSQ (Merck) à l'aide d'un appareil semi-sec (Biorad) dans un tampon Tris-glycine (glycine 0,3%, tris 0,6%, SDS 0,04% et méthanol 10 %) pendant 24 min à 100 mA par gel. Les sites de fixation aspécifiques ont été bloqués en baignant la membrane dans une solution de gélatine 3% pendant 1 h. Après 3 lavages de 5 min dans du tampon TBS-T (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20), la membrane a été mise en contact avec la solution d'anticorps primaire (anti-OutB ou anti-Lpp) dilué dans du TBS-T pendant 1 h. La membrane est relavée au TBS-T, 3 fois pendant 5 min avant d'être mise en contact avec la solution d'anticorps secondaires couplés à la peroxydase (dilués dans du TBS-T) pendant 1 h. La membrane est lavée 3 fois pendant 5 min dans du TBS-T, puis incubée dans une solution Western-HRP Luminata™ pendant 1 min et exposée sur un film autoradiographique. La peroxydase catalyse l'oxydation du luminol présent dans les réactifs. Cette réaction s'accompagne d'une émission de lumière détectable par une exposition sur un film autoradiographique ou dans un appareil qui détecte la chemoluminescence (ChemiDoc, BioRad). Les résidus d'acide N-acétyl-muramique du PG ont été révélés par Western blot, comme c'est décrit pour les anticorps : avec WGA-biotinylée, utilisée comme « premiers anticorps » et la streptavidine couplée à la peroxydase, comme « deuxièmes anticorps ».

Observation microscopique en coloration négative des mutants *ldt* et du mutant *lpp* exprimant les versions de Lpp. La structure de surface des cellules a été observée en coloration négative à partir de cultures bactériennes cultivées overnight dans le milieu riche Luria-Bertani (LB) à 30°C sous agitation). L'ultrastructure des bactéries a été observée en microscopie électronique à transmission (MET).

Préparation des échantillons de PG pour analyse par spectrométrie de masse.

Les cellules de *Dickeya dadantii* wt, *ldt03* ou *ldt84* ont été cultivées en erlenmeyer de 1 L contenant 150 mL de BL liquide additionné de glycérol, à concentration finale 0.40 %. Les cultures ont été incubées à 30°C pendant 10 heures à 115 rpm. A l'issue de la culture, les cellules ont été centrifugées 1 h à 30 °C et à 14 000 g. Le culot a été repris dans 10 mL H₂O, puis mis à bouillir gouttes par gouttes dans 20 mL de SDS 10 % pendant 1h. Le PG a été lavé cinq fois avec 10 mL H₂O en centrifugeant 15 min, à 30 °C et à 14 000 g entre chaque lavage, puis le PG a été repris dans 1 mL de Tris-HCl 10 mM pH 7,5. 10 µL de pronase (10 mg/mL) a été ajouté à l'échantillon, mis sous agitation overnight à 37 °C. Le PG ainsi digéré a été centrifugé 15 min à 30 °C à 14 000 g, puis a été lavé 2 fois avec 1 mL H₂O, en centrifugeant à 15 min à 30°C et à 14 000 g entre chaque lavage. Le culot a été resuspendu dans 1 mL NaPO₄ 20 mM pH 8. 10 µL de trypsine (10 mg/mL) a été ajouté à l'échantillon et mis sous agitation 6 h à 37 °C. Le PG digéré par la trypsine a été centrifugé 15 min à 30 °C à 14 000 g, puis a été lavé 2 fois avec 1 mL H₂O, en centrifugeant à 15 min à 30°C et à 14 000 g entre chaque lavage. Le culot a été repris dans 400 µL de NaPO₄ 25 mM pH 6, puis 10 µL de mutanolysine (20 000 U/mL) et 10 µL de lysozyme (10 mg/mL) ont été ajoutés à l'échantillon, puis mis à 37 °C overnight dans un bain-marie. L'échantillon a été centrifugé 10 min à 14 000 g, puis le surnageant a été récupéré, et a subi une réduction par l'ajout de 5 mg de NaBH₄. Le tampon borate pH 9 500 mM a été ajouté et mis à incuber 30 min à température ambiante. Enfin, 5 µL d'acide orthophosphorique 20 % a été ajouté afin d'acidifier l'échantillon à pH 3-4.

Purification d'OutB_PS par chromatographie d'affinité Strep-tag.

Production d'OutB PS Strep.

Les cellules de *Dickeya dadantii* portant le plasmide pGEMT OutB PS Strep + ldt03 (fraîchement transformées) ont été cultivées en erlenmeyer de 1 L contenant 150 mL de BL liquide additionné d'ampicilline et de glycérol, à concentration finale de 200 µg/mL et 0.40 % respectivement. Les cultures ont été incubées à 30°C overnight pendant 15 heures à 115 rpm.

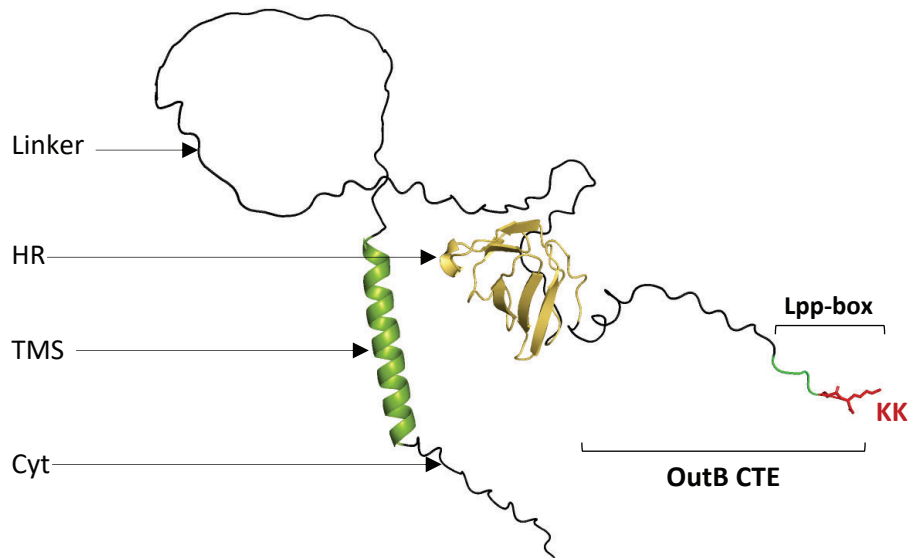
Extraction et digestion du PG.

A l'issue de la culture, les cellules ont été centrifugées. Le culot a été repris dans 10 mL de PBS, puis mis à bouillir gouttes par gouttes dans 20 mL de SDS 10% pendant 1h. Le PG a été centrifugé, remis à bouillir dans du SDS 2%, recentrifugé, puis traité de la même façon 2 fois dans du TNP-40. Le PG ainsi extrait a été repris dans 3 mL de TNP-40, puis aliquoté par 1.5 mL dans des eppendorf 2 mL. 50 µL du PG non digéré ont été collectés et conservés pour analyse sur Western blot. Afin de digérer le PG, 40 µL de lysozyme 2 mg/mL ont été additionnés à chaque eppendorf. Ces derniers sont ensuite incubés sous agitation à l'horizontal dans un bain sec à 37°C pendant 3h. A l'issue de la digestion, l'échantillon a été additionné de NP-40 à concentration finale 0.2 %, puis mis à incuber 5 min sur une roue (10 rpm). 50 µL de cet échantillon ont été collectés et conservés. Le PG digéré a été centrifugé à 14 000 g, pendant 10 minutes à 30°C. Le surnageant contenant la protéine OutB PS Strep a été récupéré, puis a été chargé sur une résine afin de procéder à la purification par chromatographie d'affinité.

Préparation de la résine et purification par chromatographie d'affinité Strep-tag.

Les purifications ont été réalisées en « batch » sur résine Strep-Tactin®XT 4Flow (IBA). 0.4 mL de résine (~0.3 mL sec) ont été utilisés pour les étapes suivantes. Toutes les solutions ont été maintenues dans la glace. La résine a été lavée 3 fois avec 900 µL d'eau stérile, puis a été équilibrée 3 fois 900 µL d'un tampon 1 (Tris HCl 100 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, triton 0.2%) en procédant par incubation de 5 minutes sur une roue (10 rpm), suivies de 2 minutes de centrifugation à 3 000 g, puis de 2 minutes de repos de la résine sur la paillasse (15 °C) afin de sédimenter la totalité des billes contenues dans la résine. 1.5 mL de l'échantillon de PG digéré ont été chargés sur 0.4 mL de la résine, puis mis à incuber pendant 2 h sur une roue à 15°C. Le surnageant a été collecté et conservé (50 µL flow-through), puis la résine a été lavée 7 fois avec 900 µL de tampon 1, puis 3 fois avec le tampon 2 (Tris HCl 100 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM). Les protéines accrochées lors des étapes précédentes ont été éluées (3 fois) par incubation de la résine avec 300 µL de tampon 3 (Tris HCl 100 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, D-biotine 50 mM, DMSO 200 mM). 50 µL de ces 3 éluations successives ont été conservées pour analyse.

A.



B.

Lpp *E. coli*

CSSNAKIDQLSSDVQTLNAKVDQLSNDVNAMRSDVQAAKDDAARANQRLDNMATKYRK⁵⁸

Lpp *D. dadantii*

CSSNAKLDQLSSDVSSLNEKVSALTSKVDALATDVQAAKDDAARANQRLDNQ**VRTTKK**

OutB *D. dadantii*

MKNTPEVKASPQTGYRIPGYLLVYALLLFTLGWFGHQRWADISPIPLSTSAAAI
 AAPPTKVGMPASTAVTADENHPGSLHAAAENSATQTAASGSQTSASSQEATPDT
 KPAKLVGTGWQTAKPGELPYIAFSAHVYTSAPDKRSVTLNGERYREGDSPYQGLVI
 EQIEQDMVIFSFNGEPFILDLSLQDWPGGKPGDDAAQGNEQEPTSKPEQT**VRTTKK**

	193	OutB CTE	220
OutB <i>D. dadantii</i>		KPGDDAAQGNEQEPTSKPEQT VRTTKK	
OutB <i>D. solani</i>		KPGTDAKDNEQEPASKPEKT VRTTKK	
OutB <i>D. dianthicola</i>		KPGTDAAQGNEQESASKPEKT VRTTKK	
OutB <i>D. chrysanthemi</i>		KPGSDADNGSTPPPSKSEKT VRTTKK	
OutB <i>D. fangzhongdai</i>		KPGADAAQVNDPEPTSKPEKT VRTTKK	
OutB <i>D. oryzae</i>		KPGSDASEDSVPKTTSKPEKTI RTTKK	
OutB <i>D. zeae</i>		KPGSDAGEDAMPKTTSKPEKTI RTTKK	
OutB <i>D. undicola</i>		KPDADATQASDPEPTSKPEKT ARTTKK	
OutB <i>D. poaceiphila</i>		KPGTGVVEGNMPKTTAKPEKTVI TTTKK	
OutB <i>D. lacustris</i>		KPDTESAAASDEPREDKPALKTPKTTNTAKRD	
OutB <i>D. aquatica</i>		KPDTDATTTNDESGESKPTLKAPKAAKTAKRD	
OutB <i>P. carotovorum</i>		KFNENERSADNQSGSATP	
GspB <i>M. paradisiaca</i>		KPDSDMIEGDSQ	

Figure. 30. A. Modèle AlphaFold d'OutB. OutB possède une courte région cytoplasmique (en noir), un segment transmembranaire d'ancrage à la MI (TMS, en vert), une partie linker non structurée (en noir) suivie d'un domaine HR (en jaune), et d'une extension C-terminale de 28 résidus (CTE) terminée par le motif Lpp-box (en vert fluo) et deux lysines (en rouge). HR : homology region ; sa structure (PDB 4WfW) a été résolue dans une étude précédente (Zhang 2022). **B. L'extrémité de la CTE d'OutB est spécifique aux bactéries du genre *Dickeya*.** L'extrémité C-terminale d'OutB de *D. dadantii* possède un motif de 6 résidus, (VRTTKK, surligné en vert) appelé Lpp-box. La Lpp-box est à un résidu près identique à celle de Lpp de *D. dadantii* (VRTYKK), mais diffère de celui de Lpp d'*E. coli* (ATKYRK). OutB de *D. solani*, *D. dianthicola*, *D. chrysanthemi* et *D. fangzhongdai* possèdent une Lpp-box identique à celle d'OutB de *D. dadantii* (VRTTKK). En revanche, OutB des autres espèces du genre *Dickeya*, à l'exception de *D. lacustris* et de *D. aquatica*, possèdent un motif très similaire comportant deux lysines C-terminales. *D. lacustris*, *D. aquatica* et *Muscola paradisiaca* (anciennement *D. paradisiaca*) constituent deux sous-groupes phylogénétiques distincts des autres *Dickeya*. Leurs OutB sont dépourvues de la Lpp-box. Les homologues d'OutB retrouvés chez les bactéries encore plus éloignées phylogénétiquement, comme *Pectobacterium*, possèdent une CTE plus courte et sont dépourvus de la Lpp-box.

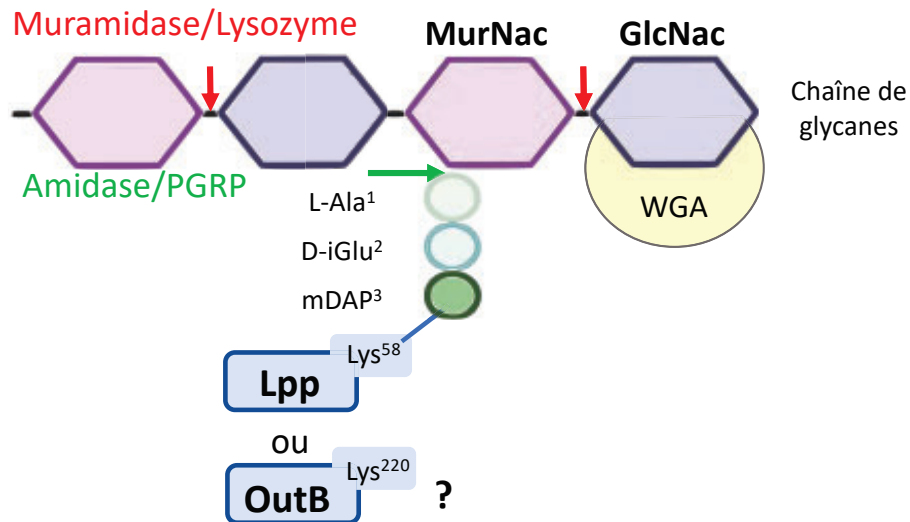
Résultats

I) L'attachement covalent d'OutB au PG de *D. dadantii*

1) OutB est attachée de manière covalente au PG de *D. dadantii*

OutB est un composant du T2SS de la γ -protéobactérie phytopathogène *Dickeya dadantii*. OutB est une protéine de 220 résidus possédant une courte région cytoplasmique, un segment transmembranaire d'ancrage à la MI, une partie linker suivie d'un domaine HR localisés dans le périplasme, et d'une extension C-terminale de 28 résidus (CTE) spécifique aux bactéries du genre *Dickeya* (Fig. 30.A et 30.B). Une étude menée au laboratoire a mis en évidence que la CTE d'OutB, interagissait avec le PG (Zhang *et al.* 2022). L'inspection de la séquence d'OutB a révélé que la CTE d'OutB de *D. dadantii*, *D. solani* et quelques autres espèces de *Dickeya* se terminait par un motif de 6 résidus (VRTTKK), similaire à l'extrémité C-terminale de Lpp de *D. dadantii* (VRTYKK), appelée par la suite, Lpp-box (Fig. 30.B). Pour rappel, Lpp est attachée de manière covalente par sa lysine C-terminale au mDAP³ du peptide-tige, via l'action enzymatique de L,D-transpeptidases (Magnet *et al.* 2007). Cela nous a laissé penser que, tout comme Lpp, OutB pourrait elle-aussi être attachée de manière covalente au PG chez *D. dadantii*. Pour tester cette hypothèse, le PG de *D. dadantii* exprimant la version sauvage d'OutB sur plasmide a été purifié par ébullition des cellules dans du SDS, suivie d'étapes successives de lavage destinées à éliminer les protéines contaminantes, y compris celles liées de manière non covalente au PG, et les résidus de détergent. A l'issue de cette étape, le PG a été digéré soit par i) le lysozyme, une muramidase qui coupe les liaisons glycosidiques des chaînes glycanes entre les résidus acide N-acétylmuramique et N-acétyl-D-glucosamine, soit par ii) l'amidase PGRP de *Sitophilus zeamais* (Maire *et al.* 2019), qui clive la liaison amide entre le résidu D-lactyl en C3 de l'acide N-acétylmuramique et le résidu L-Ala¹ du peptide-tige (Fig. 31.A). Les protéines ainsi libérées ont été analysées par SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie (Fig. 31.B). Lpp est la protéine la plus abondante chez *E. coli*, et 1/3 des molécules sont couplées de manière covalente au PG (Cowles *et al.* 2011). Une préparation intacte du PG de la souche sauvage de *D. dadantii* ne contient pas de Lpp visible au bleu de Coomassie ni avec les anticorps dirigés contre Lpp (Fig 31.B). La digestion du PG par le lysozyme cause l'apparition de sept bandes protéiques (Lpp-PG1 à 7) visibles sur gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie (Fig. 31.B). Les bandes les plus abondantes possèdent des poids moléculaires légèrement supérieurs à ceux de Lpp (~6 – 10 kDa), et quelques bandes minoritaires possèdent un poids moléculaire encore plus élevé (15 – 20 kDa) (Fig. 31.B). L'analyse de ces mêmes échantillons par Western blot révèle que ces bandes réagissent avec les anticorps anti-Lpp, et pourraient donc correspondre à Lpp attachée à des résidus de PG de taille variable (Fig. 31.B). Le traitement de l'échantillon avec l'amidase PGRP engendre l'apparition de deux bandes (Lpp-PT1 et Lpp-PT2) très proches, de plus faible poids moléculaire (6 – 8 kDa), et plus intenses, ce qui serait cohérent avec l'élimination des résidus de glycanes de ces formes de Lpp. Ces adduits correspondraient à Lpp couplée au peptide-tige (Fig. 31.B). Afin de vérifier la présence de résidus de glycanes sur ces diverses formes de Lpp générées par la digestion enzymatique du PG, nous avons réalisé un Western blot avec l'agglutinine de germe de blé (WGA), qui reconnaît spécifiquement les résidus de N-acétyl-D-glucosamine (Fig. 31.A). En accord avec notre hypothèse, WGA réagit avec les formes de Lpp libérées

A.



B.

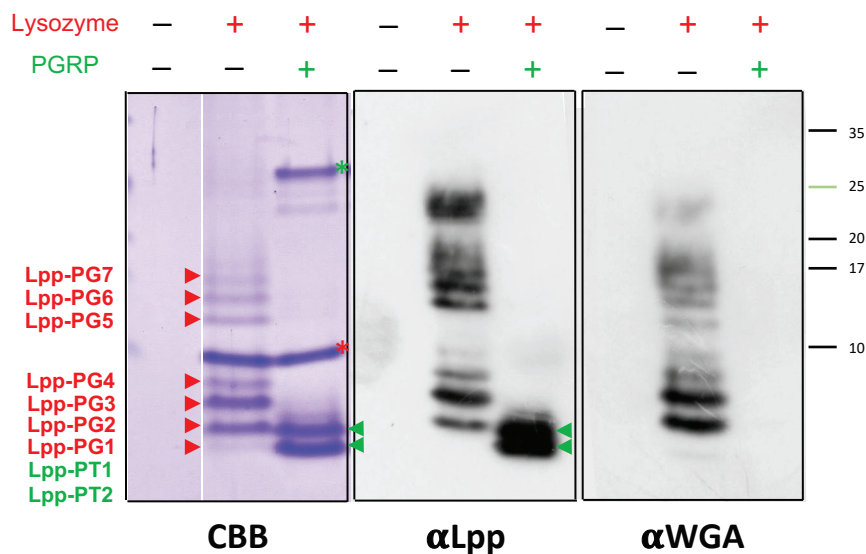


Figure. 31. Mise en évidence du couplage de Lpp au PG chez *D. dadantii*. A. Représentation schématique du couplage covalent de Lpp et de l'action du lysozyme et de l'amidase PGRP sur le PG. Le PG est constitué d'une alternance de disaccharides GlcNac-MurNac formant des chaînes de glycanes. Le MurNac porte le peptide-tige, ici constitué de trois acides aminés (L-Ala¹, D-iGlu², mDAP³). Lpp est liée de manière covalente au PG par une liaison peptidique établie entre le résidu mDAP³ du peptide-tige et la lysine C-terminale de Lpp. Le lysozyme (en rouge) est une muramidase qui coupe les chaînes de glycanes entre les résidus MurNac et GlcNac, libérant la protéine attachée au peptide-tige et à des résidus de chaîne de glycanes. L'amidase PGRP, clive la liaison entre le groupement D-lactyl en C3 du MurNac et le résidu L-Ala¹ du peptide-tige (en vert), ce qui a pour effet de libérer la protéine attachée au peptide-tige. WGA : agglutinine de germe de blé, se fixe au GlcNac. MurNac : acide N-acétylmuramique, GlcNac : N-acétyl-D-glucosamine. B. Mise en évidence du couplage covalent de Lpp au PG. Le PG de *D. dadantii* a été digéré par le lysozyme ou par PGRP. Les protéines libérées lors de la digestion du PG ont été séparées en gel SDS-PAGE (18 % tris-tricine), puis soit colorées bleu de Coomassie (à gauche), soit transférées sur une membrane et révélées avec les anticorps dirigés contre Lpp (au milieu) ou avec WGA (à droite). Lorsque le PG est digéré avec le lysozyme, 7 bandes protéiques appelées Lpp-PG1 à 7 (indiquées par les flèches rouges) sont visibles en coloration au bleu de Coomassie, et avec les anticorps anti-Lpp et WGA. Lorsque le PG est digéré par PGRP, deux bandes nommées Lpp-PT1 et 2 (en vert) de poids moléculaire plus faible que Lpp-PG sont visibles en coloration au bleu de Coomassie et avec les anticorps anti-Lpp, mais pas avec WGA. Ceci indique que ces formes de Lpp (Lpp-PT1 et Lpp-PT2) ne sont pas attachées à des résidus de glycanes. L'étoile rouge indique la position du lysozyme. L'étoile verte indique la position de PGRP.

par l'action du lysozyme, ce qui indique la présence de résidus de glycanes accrochés à Lpp (Fig. 31.B). Cependant, WGA ne reconnaît pas les formes de Lpp libérées par l'action de PGRP, ce qui est cohérent avec élimination de chaînes de glycane par l'amidase (Fig. 31.B). Ces résultats confirment donc que chez *D. dadantii*, Lpp est attachée de manière covalente aux peptides-tiges du PG. De manière intéressante, la digestion du PG par le lysozyme, comme par l'amidase PGRP, génère de multiples formes de Lpp (Lpp-PG) (Fig. 31.B). On pourrait attribuer ces formes Lpp-PG à une digestion enzymatique partielle. Or, les profils protéiques présentés ici restent stables à partir de 3 h et jusqu'à 24 h de digestion, indiquant que celle-ci est bien complète (Fig. Annexe 1). Dans le cas du lysozyme, on pourrait attribuer ces multiples formes Lpp-PG à une variabilité de la composition des chaînes de glycane. De même, les deux formes de Lpp-PT générées par l'amidase pourraient correspondre au couplage de Lpp à deux sortes de peptides-tiges différents. L'analyse par spectrométrie de masse du PG issu de deux souches de *D. dadantii* mutées pour les gènes de L,D-transpeptidases a récemment été réalisée par l'équipe de Michel Arthur. Les résultats de spectrométrie de masse ont confirmé cette dernière hypothèse (voir chapitre 'Spécificité des Ldt03 et Ldt84').

OutB est une protéine modérément exprimée, à l'inverse de Lpp qui est la protéine la plus abondante chez *E. coli* (Li *et al.* 2014). En conséquence, le niveau d'expression chromosomique d'*outB* est à peine suffisant pour bien détecter OutB dans l'extrait cellulaire de *D. dadantii* par Western blot. Afin de pallier cet inconvénient et d'évaluer le couplage potentiel d'OutB au PG, nous avons cloné le gène *outB* sous le contrôle du promoteur *Plac* inductible à l'IPTG du plasmide pGEM-T. Le pGEM-T est un plasmide à fort nombre de copies conférant la résistance à l'ampicilline, et dont l'origine de répllication (ColE1) est compatible avec la répllication chez *D. dadantii*. Le taux d'expression d'OutB sur le plasmide permet sa détection par Western blot, mais pas par coloration au bleu de Coomassie. Afin de déterminer le couplage potentiel d'OutB au PG, nous avons purifié le PG de *D. dadantii* exprimant OutB sur plasmide, nous l'avons digéré avec le lysozyme et PGRP, puis nous avons séparé les protéines libérées sur gel SDS-PAGE. L'analyse de l'échantillon de PG non digéré par Western blot avec les anticorps dirigés contre OutB montre la présence d'une bande de poids moléculaire de ~30 kDa, supérieure au poids moléculaire estimé d'OutB (23.5 kDa) (Fig. 32.A). Dans l'échantillon de PG digéré par le lysozyme, on voit apparaître trois bandes supplémentaires distinctes au-dessus de la protéine OutB (OutB-PG) (Fig. 32.A). Ces bandes supplémentaires pourraient correspondre à OutB attachée à des résidus de PG libérés par l'action du lysozyme. En accord avec cette hypothèse, l'action simultanée du lysozyme et de l'amidase PGRP sur le PG génère une bande de poids moléculaire plus faible que celles libérées par le lysozyme (OutB-PT), mais de plus grande intensité (Fig. 32.A). Cet adduit d'OutB pourrait correspondre à OutB détachée des résidus glycanes par l'action de l'amidase, mais restant toujours couplée au peptide-tige. Afin de vérifier cette hypothèse, un Western blot a été réalisé avec WGA (Fig. 32.E). Or, probablement en raison de l'abondance des formes de Lpp couplée dans cet échantillon, une longue traînée a empêché de visualiser la présence potentielle de telles formes d'OutB (Fig. 3E). Ainsi, ces résultats suggèrent qu'OutB est liée de manière covalente au PG.

Il est intéressant de noter qu'à la différence de Lpp, une fraction d'OutB, dite 'native', reste toujours présente dans l'échantillon de PG non-digéré (Fig. 32.A). On peut supposer que puisque OutB est localisée dans la membrane interne, une fraction de la protéine resterait piégée à l'intérieur du

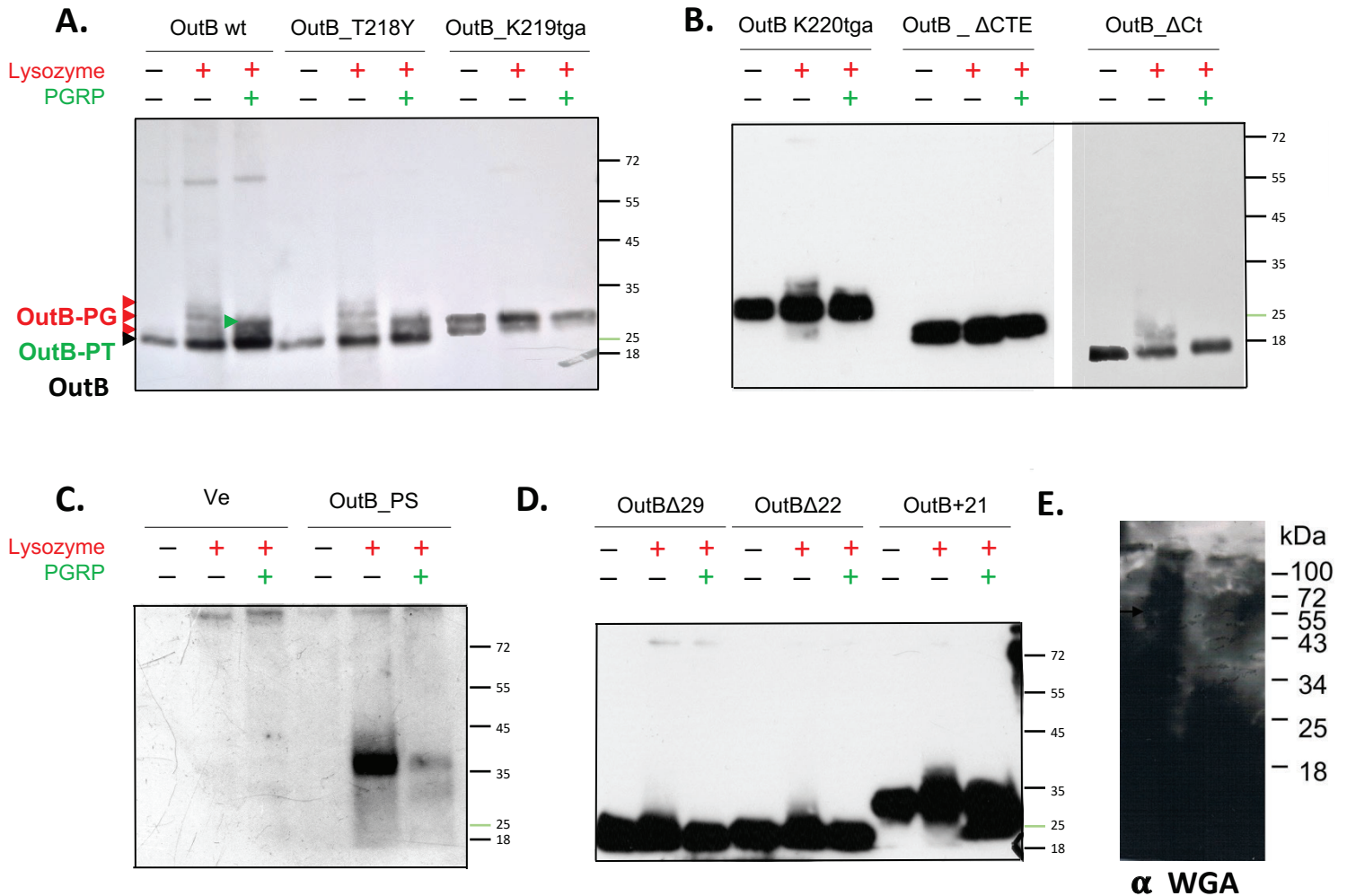


Figure. 32. Analyse du couplage d'OutB au PG chez *D. dadantii*. Le PG de *D. dadantii* exprimant les versions d'OutB (représentées schématiquement sur la Fig. 33) sur plasmide a été digéré par le lysozyme et/ou PGRP. Les protéines libérées ont été séparées sur gel SDS-PAGE (10 % tris-glycine) puis analysées par Western blot avec les anticorps anti-OutB. **A.** Comme pour *Lpp*, des formes d'OutB couplées au PG (OutB-PG) sont générées par la digestion du PG au lysozyme. Une forme d'OutB de plus faible poids moléculaire (OutB-PT) est générée par la digestion du PG par PGRP. La bande protéique visible dans l'échantillon de PG non digéré correspondrait à une forme d'OutB piégée dans le saccule, libérée lors de la digestion enzymatique du PG. Tout comme OutB wt, la version OutB_T218Y mimant l'extrémité C-terminale de *Lpp* est couplée au PG. En revanche, la délétion des deux lysines C-terminales (OutB_K219tga) abolit le couplage d'OutB au PG, ce qui indique que celles-ci sont importantes pour ce phénomène. **B.** L'unique lysine C-terminale du variant (OutB_K220tga) permet son couplage au PG. La délétion de l'entièreté de la CTE d'OutB abolit son couplage au PG (OutB_ΔCTE), tandis qu'OutB possédant une CTE raccourcie, mais préservant la *Lpp*-box, est toujours couplée au PG (OutB_ΔCt). **C.** L'absence de visualisation de formes d'OutB lors de l'expression du vecteur vide chez *D. dadantii* indique que le taux d'expression d'OutB chromosomique n'est pas suffisante pour une détection par Western blot. La version OutB_PS est couplée au PG, puisque la digestion du PG par le lysozyme libère une bande protéique détectable avec les anticorps anti-OutB. La digestion du PG avec PGRP engendre une forte diminution de l'intensité de cette bande. Il faut noter que le poids moléculaire observé d'OutB_PS couplée aux résidus de PG est beaucoup plus élevé que celui attendu. **D.** La digestion par le lysozyme du PG des souches exprimant les versions raccourcies d'OutB (OutBΔ29 et OutBΔ22) génère une traînée qui correspondrait à OutB couplée aux résidus de PG, et qui disparaît lors de la digestion avec PGRP. La traînée générée par la digestion du PG avec OutB+21 est plus nette et disparaît elle-aussi avec la digestion du PG par PGRP. **E.** La visualisation des formes d'OutB couplées au PG n'est pas possible avec WGA, puisqu'une traînée de formes abondantes de *Lpp* couplées au PG génère un fond très intense.

saccule malgré les multiples lavages. Cependant, cette forme d'OutB serait libérée lors de la digestion du saccule par le lysozyme ou lors de la migration sur gel SDS-PAGE. En effet, même si le poids moléculaire estimé d'OutB est de 23.5 kDa, son PM apparent sur SDS-PAGE est \sim 30 kDa. Par ailleurs, le segment transmembranaire d'OutB, enchaîné dans les micelles de détergent, pourrait augmenter la taille réelle de la protéine. Cette hypothèse est appuyée par le fait que toutes les versions d'OutB, excepté celle dépourvue du TMS, ont été partiellement piégées dans l'échantillon de PG non digéré (Fig. 32.A à 32.D).

a. Identification des régions d'OutB indispensables à son couplage au PG

Par la suite, nous avons souhaité identifier les régions d'OutB indispensables à son couplage au PG. Afin d'évaluer l'importance de l'ancrage d'OutB à la membrane interne sur le couplage au PG, nous avons construit une version appelée OutB_PS, dans laquelle la région transmembranaire d'OutB a été remplacée par un peptide-signal (Fig. 33.A). Cette modification permet l'exportation par le système Sec d'une version soluble d'OutB dans le périplasma. Ainsi, si l'attachement à la membrane interne est important pour le couplage d'OutB au PG, on s'attend à ce que cette forme périplasmique d'OutB ne soit pas attachée de manière covalente au PG. L'analyse du PG de la souche exprimant OutB_PS montre qu'aucune forme d'OutB_PS n'est visible dans l'échantillon non digéré au lysozyme (Fig. 32.C). Cela signifierait que cette version d'OutB est efficacement éliminée lors des lavages du PG, et qu'elle serait capable de passer à travers les pores du saccule, ce qui est cohérent avec la taille attendue d'OutB_PS (19 kDa) (Fig. 32.A). Curieusement, la digestion du PG par le lysozyme engendre l'apparition d'une bande protéique de \sim 40 kDa, ce qui ne correspond pas au poids moléculaire attendu pour cette version d'OutB couplée aux résidus de PG. Toutefois, la digestion du PG avec l'amidase PGRP engendre l'apparition d'une bande protéique de poids moléculaire et d'intensité plus faible, qui pourrait être compatible avec une version d'OutB couplée au peptide-tige (Fig. 32.C). Ces résultats démontrent que l'ancrage à la MI n'est pas nécessaire pour le couplage d'OutB au PG, puisqu'OutB_PS accède au PG et y est attaché.

Durant ma thèse, une version d'OutB_PS taguée d'une étiquette d'affinité à la streptavidine a été purifiée par chromatographie d'affinité. Cette version d'OutB a été préférée à OutB sauvage car elle ne présentait pas de protéine contaminante non liée au PG (voir échantillons non digérés au PG). En effet, l'abondance de protéine OutB non liée au PG dans l'échantillon OutB sauvage, pourrait nuire à la détection des formes d'OutB couplées par spectrométrie de masse, car celles-ci sont minoritaires. Une expérience en cours au laboratoire et en collaboration avec l'équipe de Michel ARTHUR (Sorbonne Université, Paris) va permettre d'identifier la nature des résidus attachés à OutB_PS par HPLC-MS/MS.

Ensuite, nous avons voulu évaluer l'impact de la longueur du linker périplasmique d'OutB sur son couplage au PG (Fig. 32.E et 33.A). En effet, le PG occuperait une place bien définie dans le périplasma, car l'espacement entre la ME et le PG est définie par la longueur de Lpp (Cohen *et al.* 2017; Mandela *et al.* 2022), et l'espace entre la MI et le PG serait maintenu par la protéine de la membrane interne TolR (Boags *et al.* 2019). Ainsi, en étant numériquement faible, OutB ne devrait pas affecter

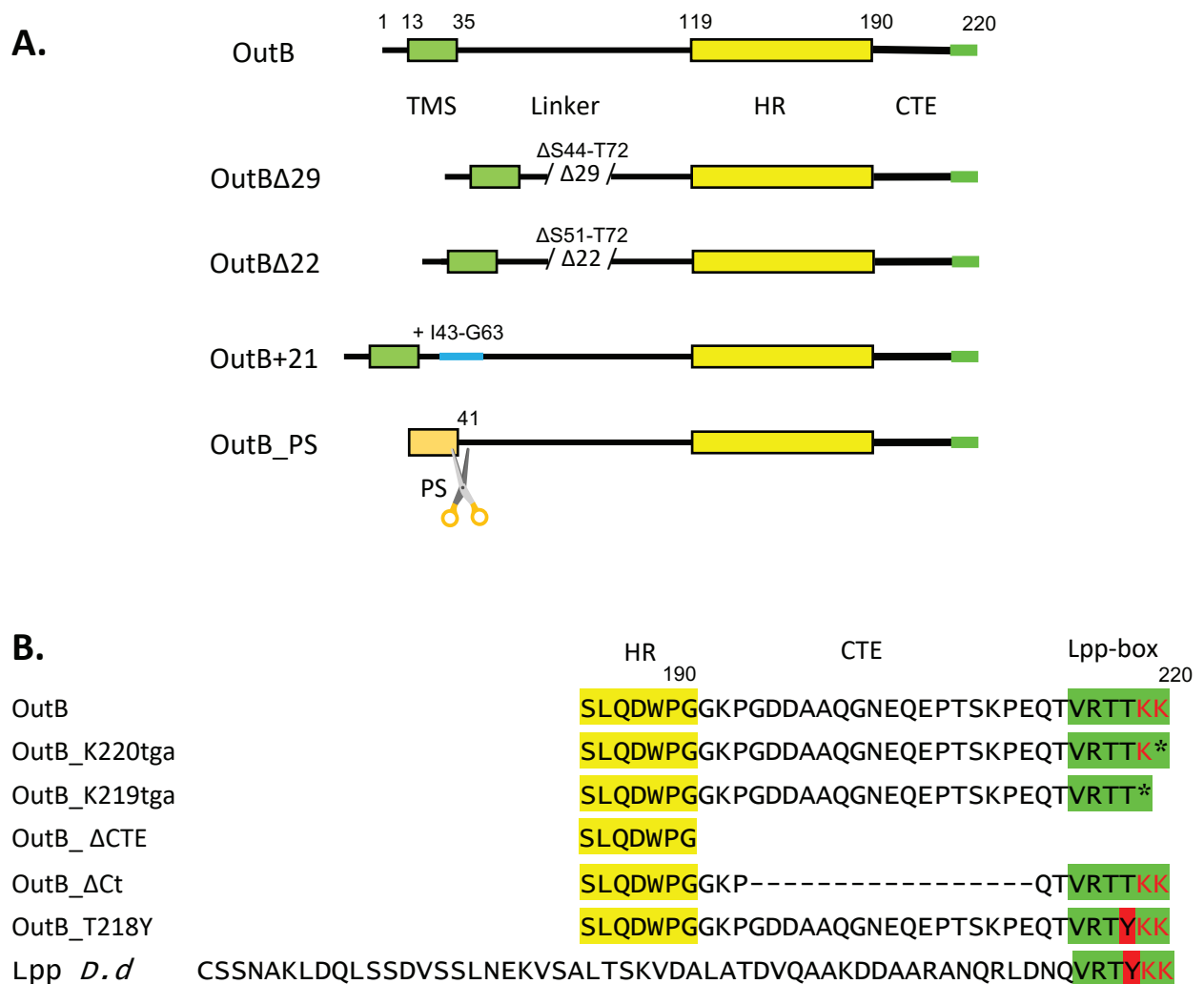


Figure. 33. A. Représentation schématique des versions d'OutB utilisées lors de ces travaux. La protéine OutB possède une courte région cytoplasmique, une hélice transmembranaire (TMS) d'ancrage à la MI (en vert), et dans le périplasma un linker suivi d'un domaine HR (en jaune) et une extension C-terminale (CTE). Les résidus délétés, substitués ou additionnés sont indiqués pour chaque variant. Dans OutB_PS, le segment transmembranaire a été remplacé par le peptide-signal (en orange), qui est ensuite clivé par la signal-peptidase lors de l'exportation d'OutB_PS dans le périplasma. **B. Représentation des versions d'OutB dont la CTE a été modifiée.** La CTE se termine par la Lpp-box de 6 résidus (en vert), identique à un acide aminé près à celle de Lpp de *D. dadantii*. Les deux résidus lysines ont été délétés unes à unes afin d'évaluer le couplage d'OutB au PG (OutB_K220tga et OutB_K219tga). Dans la version OutB_ΔCTE, la CTE a été délétée complètement, tandis que dans la version OutB_ΔCt, la CTE a été raccourcie tout en préservant la Lpp-box. Enfin, la thréonine²¹⁸ a été substituée par une tyrosine (OutB_T218Y) afin que la CTE d'OutB soit parfaitement identique à l'extrémité C-terminale de Lpp de *D. dadantii*.

l'espace entre la MI et le PG, mais au contraire, OutB pourrait subir des contraintes de taille pour accéder et se coupler au PG. La région linker d'OutB de 75 résidus, située entre le segment transmembranaire et le domaine HR, ne semble pas posséder une structure secondaire bien définie sur le modèle AlphaFold d'OutB (Fig. 30.A). Ainsi, nous avons pensé que la région linker d'OutB pourrait assurer l'accessibilité de la région CTE d'OutB à la couche de PG. Si cette hypothèse est vraie, l'extension ou le raccourcissement du linker d'OutB devrait par conséquent éloigner, ou respectivement rapprocher, la CTE de la couche de PG, ce qui pourrait affecter son couplage au PG. Ainsi, pour tester cette hypothèse, nous avons construit les versions raccourcies d'OutB, délétées de 29 ou 22 résidus (OutB Δ 29, OutB Δ 22), respectivement délétées au niveau de la Ser44 à la Thr72 et de la Ser51 à la Thr72, et une version plus longue d'OutB, additionnée de 21 résidus au niveau de l'Ile43 à la Gly63 (OutB+21) (Fig. 33.A). Ces versions modifiées d'OutB ont été exprimées chez *D. dadantii* et leur couplage au PG a été évalué par Western blot (Fig. 32.D). L'analyse du PG de la souche exprimant OutB Δ 29 montre que le PG intact présente une bande protéique de poids moléculaire de ~20 kDa, ce qui est compatible avec le poids moléculaire attendu de cette version d'OutB. Bien que les bandes nettement observées avec OutB sauvage ne soient pas observables avec cette version d'OutB, une forme d'OutB de plus haut poids moléculaire représentée par une traînée est détectée à la suite de la digestion du PG par le lysozyme (Fig. 32.D). Le profil du PG suggère qu'OutB Δ 29 est liée au PG. La digestion du PG par PGRP fait disparaître cette traînée d'OutB, ce qui signifie qu'OutB était couplée à des résidus de glycanes (Fig. 32D). Chez le PG de la souche exprimant OutB Δ 22, on peut remarquer que la digestion du PG par le lysozyme entraîne également l'apparition d'une traînée d'OutB de plus haut poids moléculaire, en accord avec la longueur plus importante d'OutB (Fig. 32D). De même, la digestion du PG avec PGRP entraîne la disparition de la traînée (Fig. 32D). Le PG intact de la souche exprimant OutB+21 montre la présence d'une forme d'OutB de ~33 kDa (Fig. 32D). Comme précédemment, la digestion du PG avec le lysozyme libère une forme d'OutB de plus haut poids moléculaire plus abondante qu'avec les versions d'OutB Δ 29 et OutB Δ 22. Ces formes d'OutB disparaissent avec la digestion du PG avec PGRP (Fig. 32D). Les formes d'OutB de plus haut poids moléculaire détectées lors de la digestion par le lysozyme les variants OutB Δ 29, OutB Δ 22 et OutB+21, témoignent de leur capacité à interagir et à se coupler au PG (Fig. 32D). Toutefois, la présence de formes non couplées d'OutB dans la fraction du PG non digéré rend difficile la détection de formes couplées (Fig. 32D). Néanmoins, ces résultats suggèrent que les tailles du linker périplasmique d'OutB testées permettent toujours le couplage d'OutB au PG. Ainsi la construction de dérivés d'OutB portant un linker encore plus court pourrait permettre de déterminer la taille minimale requise pour le couplage d'OutB au PG de *D. dadantii*. Finalement, il faut aussi prendre en compte qu'au sein du T2SS, le domaine HR, situé juste avant la CTE, interagit avec le domaine N0 de la sécrétine (Zhang *et al.* 2022). Ainsi la longueur apparemment excessive du linker d'OutB pourrait permettre à l'accès du domaine HR d'OutB au domaine N0 de la sécrétine.

b. Identification des résidus de la CTE d'OutB impliqués dans son couplage au PG

La CTE d'OutB est composée de 28 résidus y compris la Lpp-box de 6 résidus, située en son extrémité C-terminale (Fig. 30A). Afin d'examiner l'importance de cette région, tout d'abord la totalité

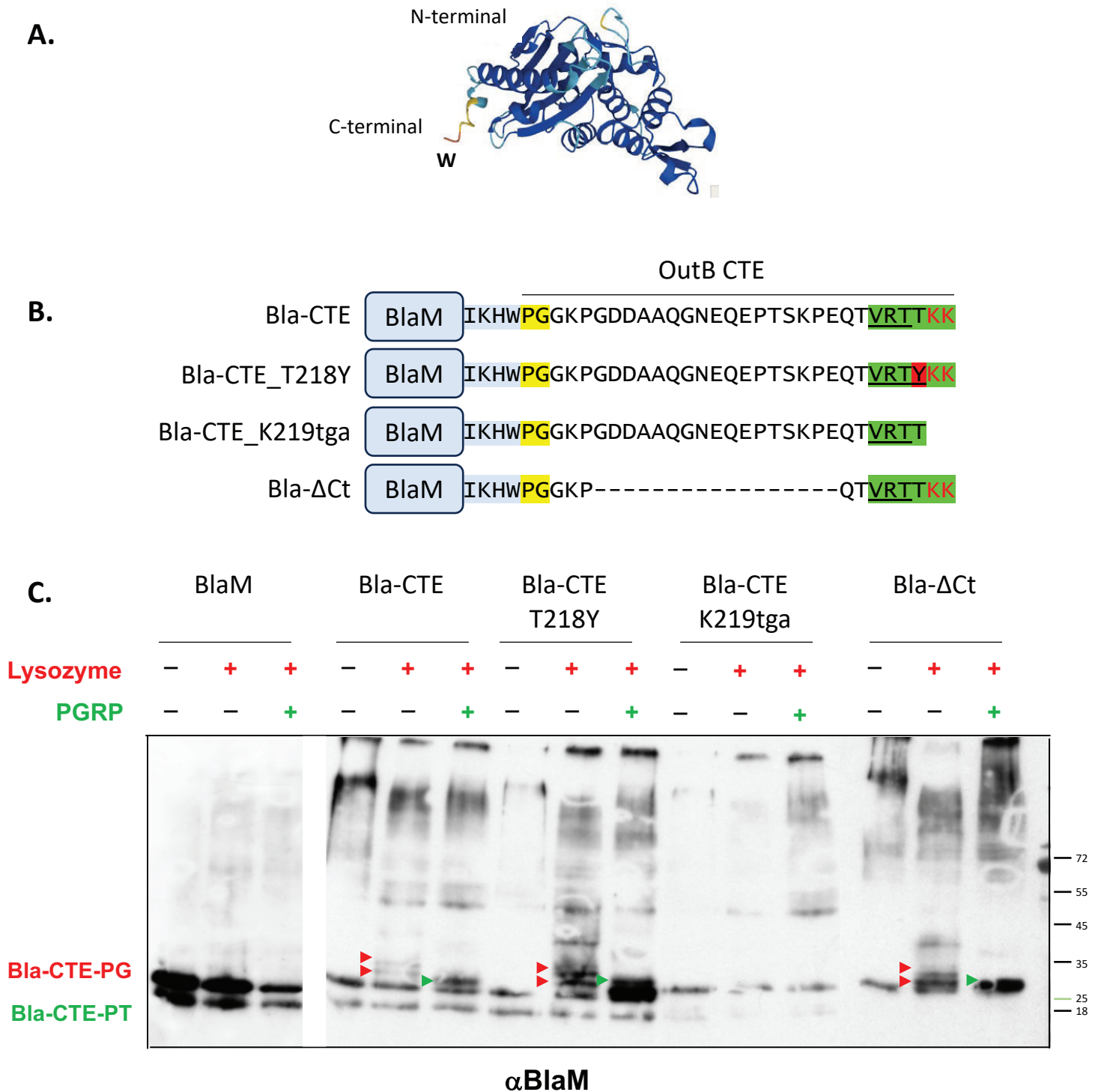


Figure. 34. La fusion de la protéine rapportrice BlaM (β-lactamase périplasmique) à l'extension C-terminale d'OutB permet son attachement covalent au PG. A. Modèle AlphaFold de BlaM. B. Représentation schématique des fusions Bla-CTE utilisées. La CTE d'OutB comprenant la Lpp-box (en vert) a été fusionnée à l'extrémité C-terminale de BlaM (en bleu). La version Bla-ΔCt possède l'extrémité C-terminale raccourcie, mais porte toujours la Lpp-box, tandis que la Lpp-box de Bla-CTE_T218Y est identique à celle de Lpp de *D. dadantii* (tyrosine en rouge). **C. Analyse du couplage des fusions Bla-CTE au PG de *D. dadantii*.** Le peptidoglycane des cellules *D. dadantii* exprimant les fusions Bla-OutB présentées en B. a été digéré avec du lysozyme en combinaison ou non avec l'amidase PGRP. Les protéines ont été séparées sur gel SDS-PAGE, puis analysées par Western blot avec les anticorps anti-BlaM. La digestion du PG par le lysozyme génère les formes de Bla-OutB couplées au PG (Bla-CTE-PG, flèches rouges), et la digestion du PG par PGRP produit une forme plus petite (Bla-CTE-PT, flèches vertes) (échantillons Bla-CTE, Bla-CTE_T218Y et Bla-ΔCt). La délétion des deux lysines C-terminales de la fusion Bla-CTE abolit son couplage au PG

de la CTE a été éliminée par l'insertion d'un codon stop à la place du codon G193 d'OutB (OutB Δ CTE) (Fig. 33B). L'analyse du PG intact de la souche exprimant le variant OutB Δ CTE montre la présence d'une bande protéique de ~25 kDa (Fig. 32.B). En revanche, aucune forme d'OutB n'est détectable lors de la digestion du PG avec le lysozyme ou PGRP (Fig. 32.B). Ce résultat signifie qu'OutB Δ CTE n'est pas couplée au PG, et suggère que le site de couplage d'OutB se situe dans la CTE (Fig. 33.B). La zone de la CTE située en amont de la Lpp-box est riche en acides aminés chargés. De fait, celle-ci pourrait être impliquée dans l'interaction avec le PG, et donc influencer le couplage covalent d'OutB. Afin de tester cette hypothèse, nous avons construit une version raccourcie de la CTE, déléetée des résidus 196 à 212, située en amont de la Lpp-box, tout en conservant la Lpp-box (OutB_ Δ Ct) (Fig. 33.B). L'analyse du PG de la souche exprimant ce variant d'OutB montre qu'OutB Δ CTE est présent dans le PG intact (bande protéique à ~25 kDa) et que la digestion du PG avec le lysozyme libère une forme d'OutB de plus haut poids moléculaire, qui disparaît avec la digestion de PGRP (Fig. 32.B). Ce résultat signifie qu'OutB_ Δ Ct est couplé au PG, et suggère que la région de la CTE en dehors de la Lpp-box n'est pas essentielle pour le couplage covalent. Ainsi, il est probable qu'un ou plusieurs résidus de la Lpp-box soient responsables du couplage au PG (Fig. 33.B). Il est toutefois probable que les 22 résidus de la CTE situés en amont de la Lpp-box permettent de garder un espace suffisant entre le domaine HR et la Lpp-box. En effet, dans ces expériences, le taux d'expression d'OutB (à partir d'un plasmide) a été bien plus fort que le niveau natif chromosomique. La majeure partie d'OutB n'était donc pas associée avec le système T2SS. Or, au sein du T2SS, OutB subit une contrainte spatiale supplémentaire puisque son domaine HR interagit avec le domaine NO de la sécrétine. Dans cette situation, un espacement entre le domaine HR et la Lpp-box pourrait jouer un rôle plus évident.

La CTE d'OutB se termine par une séquence de 6 résidus (VRTTKK) qui, à un résidu près, est identique à celle de Lpp de *D. dadantii* (VRTYKK) (Fig. 30.B). En effet, un résidu thréonine est à la place du résidu tyrosine en quatrième position de l'extrémité C-terminale (Fig. 30.B). Chez *E. coli*, Lpp se termine par une séquence ATKYRK et est attachée au groupement carboxyle du carbone α du mDAP³ d'un peptide-tige par l'amine ϵ de sa lysine C-terminale (Magnet *et al.* 2007) (Fig. 30.B). La pénultième arginine de Lpp d'*E. coli* ne serait pas directement impliquée dans le couplage de Lpp au PG, mais constituerait une charge positive indispensable à son couplage (Zhang et Wu 1992). Puisqu'OutB et Lpp de *D. dadantii* se terminent par une double lysine (au lieu de RK chez *E. coli*), nous avons souhaité évaluer la capacité des deux lysines d'OutB à se lier au PG (Fig. 33.B). Pour cela, nous avons construit deux versions d'OutB par l'insertion d'un codon stop : l'une déléetée d'une lysine C-terminale (OutB_K220tga), l'autre déléetée des deux lysines C-terminales (OutB_K219tga). Nous avons par la suite testé la capacité de ces versions d'OutB à se lier au PG (Fig. 32. A, 32.B et 33.B). La digestion du PG de la souche exprimant la version OutB_K219tga par le lysozyme ne libère aucune forme supplémentaire d'OutB (Fig. 32.A). Un résultat similaire est observé lors de la digestion du PG avec PGRP (Fig. 32.A), signifiant qu'OutB_K219tga n'est pas couplée au PG. Ce résultat est en accord avec l'hypothèse selon laquelle OutB est couplée au PG par une de ses deux lysines C-terminales. Afin de déterminer si une seule lysine pouvait suffire au couplage d'OutB, nous avons testé la capacité d'OutB_K220tga, ne possédant qu'une seule lysine C-terminale, à se lier au PG (Fig. 32.B). L'analyse du PG de la souche exprimant cette version révèle que des formes d'OutB de plus haut poids moléculaire apparaissent lors de la digestion du PG avec le lysozyme, et qu'une bande de poids moléculaire plus faible apparaît

A.

Lpp wt	CSSNAKLDQLSSDVSSLNEKVSALTSKVDALATDVQAAKDDAARANQRLDNOV	RTYKK
OutB (CTE 180-220)	PFILDSLQDW	PGGKPGDDAAQDNEQEPTSKPEQTVRTTKK
Lpp:OutB #3	CSSNAKLDQLSSDVSSLNEKVSALTSKV	P P ₁ LEV P GGKPGDDAAQ D NEQEPTSKPEQTVRTTKK
Lpp:OutB #4	CSSNAKLDQLSSDVSSLNEKVSALTSKV	E V P GGKPGDDAAQ D NEQEPTSKPEQTVRTTKK
Lpp:OutB #5	CSSNAKLDQLSSDVSSLNEKVSALTSKV	D DDAAQ D NEQEPTSKPEQTVRTTKK
Lpp:OutB #6	CSSNAKLDQLSSDVSSLNEKVSALTSKV	D AAQ D NEQEPTSKPEQTVRTTKK
Lpp:OutB #7	CSSNAKLDQLSSDVSSLNEKVSALTSKV	P GGKPGDDAAQ D NEQEPTSKPEQTVRTTKK
Lpp:OutB #9	CSSNAKLDQLSSDVSSLNEKVSALTSKV	P P ₁ LEV P GGK V DDAAQ D NEQEPTSKPEQTVRTTKK
Lpp:OutB #10	CSSNAKLDQLSSDVSSLNEKVSALTSKV	D ALAT D G D DAARANQRLDNOV RTYKK
Lpp:OutB #11	CSSNAKLDQLSSDVSSLNEKVSALTSKV	D ALAT D G D DDAAQ D NEQEPTSKPEQTVRTTKK
Lpp:OutB #12	CSSNAKLDQLSSDVSSLNEKVSALTSKV	D ALAT D V DDAAQ D NEQEPTSKPEQTVRTTKK
Lpp wt	CSSNAKLDQLSSDVSSLNEKVSALTSKVDALATDVQAAKDDAARANQRLDNOV	RTYKK
Lpp+21	CSSNAKLDQLSSDVSSLNEKVSALTSKV/	+21 EQLSSDVSSLNEKVSALTSKV/DALATDVQAAKDDAARANQRLDNOV RTYKK
LppΔ21	CSSNAKL//	DALATDVQAAKDDAARANQRLDNOV RTYKK Δ21

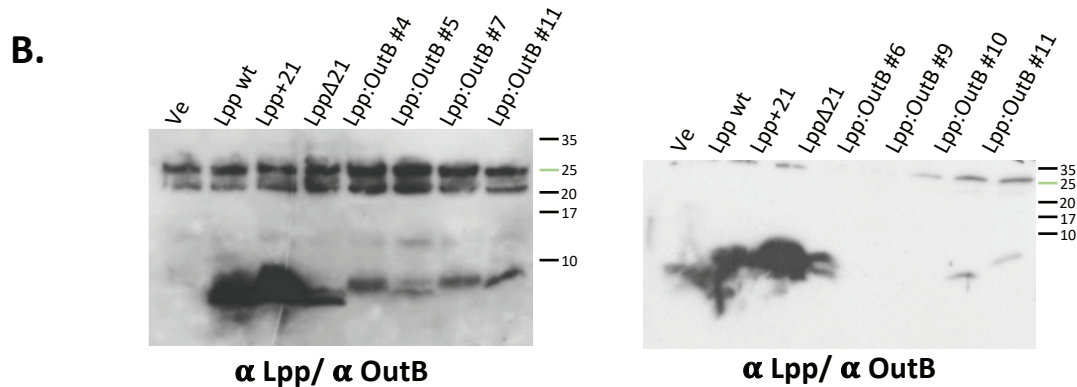


Figure. 35. A. Séquence des fusions entre Lpp et l'extrémité C-terminale d'OutB (Lpp:OutB), et des versions allongée et raccourcie de Lpp. Les variants Lpp:OutB ont été construits en substituant les 30 résidus C-terminaux de Lpp par une séquence d'une longueur équivalente issue de la CTE d'OutB. Les résidus proline (P, en gris) sont supposés casser la structure secondaire de l'hélice- α . Dans la version Lpp:OutB#12, seuls 23 résidus C-terminaux de Lpp ont été substitués par la CTE d'OutB pour mieux préserver la structure de Lpp. **B. Analyse de la production des constructions de Lpp et des fusions Lpp:OutB chez *D. dadantii*.** Les versions de Lpp et des fusions Lpp:OutB ont été exprimées chez *D. dadantii* lpp à partir d'un plasmide PGEM-T. Les cellules ont été cultivées en présence de l'inducteur IPTG, puis lysées et les protéines ont été séparées sur gel SDS-PAGE (18 % tris-tricine), puis analysées par Western blot avec les anticorps anti-Lpp et anti-OutB. Les versions Lpp+21 et LppΔ21 sont produites à un taux équivalent à Lpp wt. En revanche, les versions Lpp:OutB semblent être produites beaucoup plus faiblement, suggérant qu'elles sont probablement instables et dégradées.

lors de la digestion avec PGRP (Fig. 32.B). Ce résultat démontre qu'OutB_K220tga est couplée au PG, bien que celle-ci ne possède qu'une seule charge positive C-terminale (Fig. 33.B). Ainsi, une seule lysine C-terminale semble être suffisante au couplage d'OutB au PG. La seule différence entre les Lpp-boxes de Lpp et d'OutB réside dans l'antépénultième résidu, respectivement la tyrosine versus la thréonine (Fig. 33B). Nous avons donc substitué la Thr218 de la Lpp-box d'OutB par une tyrosine (OutB_T218Y), afin que son extrémité C-terminale soit identique à celle de Lpp (Fig. 33.B). Cette substitution a conservé le couplage d'OutB au PG, puisque des bandes de haut poids moléculaire correspondant à OutB couplée au PG sont visibles dans le PG digéré au lysozyme, et qu'une bande de poids moléculaire plus faible est visualisable lors de la digestion avec PGRP (Fig. 32.A).

L'ensemble de ces résultats démontre que la lysine C-terminale de la Lpp-box d'OutB permet le couplage d'OutB au PG. De plus, il semblerait qu'OutB puisse être couplée soit sur la dernière soit sur l'avant-dernière lysine C-terminale, au moins, lorsque celle-ci devient le dernier résidu (comme dans OutB_K220tga). Toutefois, nos résultats ne permettent pas de déterminer si ces deux lysines sont couplées *in vivo*. Afin d'apporter une preuve irréfutable du couplage d'OutB au PG, la protéine attachée au PG a été purifiée, et sera analysée ultérieurement par HPLC-MS afin de déterminer les résidus impliqués dans cet attachement.

2) La Lpp-box d'OutB, une séquence de liaison « universelle » au PG chez *D. dadantii* ?

Étant donné que la CTE d'OutB ne possède pas de structure secondaire particulière (modèle AlphaFold) (Fig. 30.A), nous avons pensé que l'ajout de cette séquence à une protéine rapportrice permettrait le couplage de cette dernière au PG. Autrement dit, nous avons cherché à savoir si la CTE d'OutB pouvait constituer une séquence de liaison « universelle » au PG chez *D. dadantii*. Pour tester cette hypothèse, nous avons fusionné la CTE d'OutB à l'extrémité C-terminale de la β -lactamase périplasmique BlaM (Fig. 34). Afin d'assurer une meilleure flexibilité de la CTE, la séquence Pro-Gly-Gly a été placée entre BlaM et la CTE (Fig. 34.B). Par ailleurs, pour mieux évaluer l'importance de la zone de la CTE en dehors du motif Lpp, deux versions de CTE ont été utilisées : une version entière de la CTE, donnant lieu à Bla-CTE et une version de la CTE raccourcie de 17 résidus, mais conservant la Lpp-box, Bla- Δ Ct (Fig. 34.B). Ainsi ces deux fusions miment respectivement, OutB elle-même et la variante OutB_ Δ Ct analysées plus haut (Fig. 33.B). Les deux fusions Bla-CTE ont été exprimées chez *D. dadantii* et les protéines libérées par la digestion du PG ont été analysées par Western blot avec les anticorps dirigés contre BlaM. Les résultats montrent que les versions Bla-CTE et Bla- Δ Ct sont couplées au PG de manière similaire puisque la digestion du PG par le lysozyme engendre l'apparition de deux bandes (Bla-OutB-PG) et la digestion du PG avec PGRP engendre l'apparition d'une bande protéique de poids moléculaire plus faible (Bla-OutB-PT) (Fig. 34.C). En accord avec le rôle des lysines C-terminales dans le couplage d'OutB, la délétion de deux lysines C-terminales de Bla-CTE (Bla-CTE_K219tga) a aboli son couplage au PG (Fig. 34.C). La substitution de la thréonine par la tyrosine de Lpp (Bla-CTE_K218Y) conserve le couplage covalent au PG (Fig. 34.C). Ces résultats démontrent que la Lpp-box d'OutB

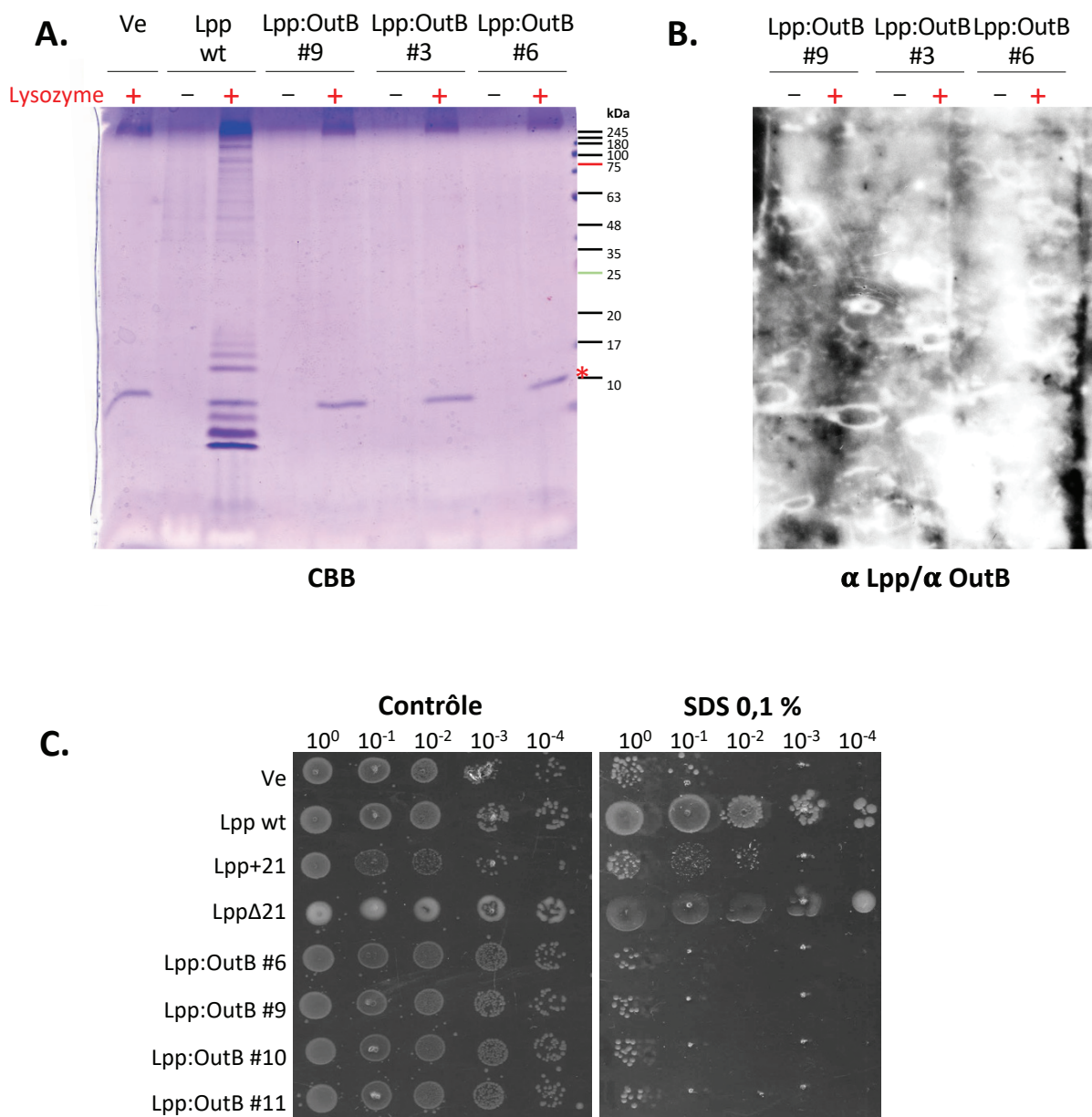


Figure 36. A et B. Evaluation du couplage au PG des fusions Lpp:OutB au PG de *D. dadantii*. Le PG de la souche mutante *lpp* de *D. dadantii* exprimant les versions Lpp:OutB a été digéré au lysozyme. Les protéines ainsi libérées ont été séparées sur gel SDS-PAGE (18 % tris-tricine), puis colorées au bleu de Coomassie (**A**) ou analysées par Western blot avec les anticorps anti-Lpp et anti-OutB (**B**). Aucune version Lpp:OutB ne semble pas être couplée au PG, puisque les formes de Lpp-PG ne sont ni visibles en bleu de Coomassie, ni en Western blot. L'étoile rouge indique le lysozyme. **C. Test de sensibilité au SDS du mutant *lpp* de *D. dadantii* exprimant les fusions Lpp:OutB.** Aucune fusions Lpp:OutB analysée ne restaure la résistance au SDS, contrairement à Lpp wt.

composée de six résidus C-terminaux constitue une véritable séquence de couplage permettant l'attachement d'OutB et de la protéine rapportrice BlaM au PG chez *D. dadantii*.

Suivant la même logique, nous avons cherché à savoir si la CTE d'OutB pouvait se substituer fonctionnellement à l'extrémité C-terminale de Lpp. Pour cela, nous avons substitué les 30 résidus C-terminaux de Lpp par une séquence d'une longueur équivalente issue de la CTE d'OutB. Ainsi, neuf variants de cette fusion, appelée Lpp:OutB (#3, #4, #5, #6, #7, #9, #10, #11, #12) ont été construits (Fig. 35.A), car il est difficile de prédire *a priori* la stabilité de telles constructions (Fig. 35.B). Afin d'évaluer leur couplage au PG et d'éviter une compétition avec la Lpp sauvage, ces constructions ont été exprimées dans le mutant *lpp* de *D. dadantii*. Dans un premier temps, nous avons réalisé des tests de sensibilités au SDS, afin d'évaluer la capacité de ces fusions à compléter l'absence de Lpp. En effet, Lpp étant responsable de l'attachement covalent de la ME au PG, son couplage permet de maintenir la stabilité de l'enveloppe bactérienne. Ainsi, si Lpp n'est pas couplée au PG, la ME n'est pas attachée au PG et celle-ci forme des vésicules extracellulaires, témoignant de la déstabilisation de l'enveloppe. L'enveloppe déstabilisée présente ainsi une sensibilité accrue au détergent (Mathélié-Guinlet *et al.* 2020). L'expression des fusions Lpp:OutB dans un mutant *lpp* de *D. dadantii* ne restaure pas la résistance au SDS, contrairement à l'expression de Lpp sauvage (Fig. 36.C). Ce résultat suggère que ces versions ne sont pas fonctionnellement actives, car soit pas assez produites soit, ne sont pas couplées au PG. L'analyse de lysats de cellules exprimant les fusions Lpp:OutB par Western blot avec un mélange d'anticorps dirigés contre Lpp et contre OutB révèle que les constructions Lpp:OutB sont faiblement produites, par rapport à Lpp sauvage (Fig. 35.B). Il est probable que de telles constructions ne soient pas stables, et soient dégradées par la cellule. Or, on ne peut pas être sûr de la quantité réelle de ces fusions, car la délétion de la moitié de la séquence de Lpp a certainement éliminé un nombre important d'épitopes reconnus par les anticorps polyclonaux contre Lpp. D'un autre côté, on ne sait pas non plus si les anticorps polyclonaux contre OutB (utilisés en même temps) reconnaissent bien la CTE d'OutB présente dans les fusions Lpp:OutB. Nous avons donc souhaité évaluer le couplage de ces fusions au PG par SDS-PAGE. Comme Lpp est très abondante, l'analyse de son couplage au PG est tout d'abord réalisée par SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie (Fig. 36.A), ou par Western blot avec les anticorps dirigés contre Lpp si les variants ne sont pas visibles par coloration au bleu de Coomassie (Fig. 36.B). L'analyse du PG du mutant *lpp* de *D. dadantii* exprimant les fusions Lpp:OutB révèle qu'aucun variant analysé n'est détectable lié au PG de façon covalente, et ce même, en Western blot avec les anticorps dirigés contre Lpp ou contre OutB (Fig. 36.B). Ce résultat est donc en accord avec les tests de sensibilité au SDS (Fig. 36.C). Ainsi, la substitution de l'extrémité C-terminale de Lpp par celle d'OutB ne semble pas être fonctionnelle, et ne peut pas compenser l'absence de la moitié C-terminale de Lpp. Ces deux expériences (avec BlaM et Lpp:OutB) indiqueraient que la séquence C-terminale d'OutB peut constituer un motif d'accrochage au PG si la structure secondaire et/ou le repliement de la protéine le permet. Dans le cas de la fusion Bla-CTE, la CTE a été fusionnée à un domaine protéique bien compact et donc stable (Fig. 34.A). Or, dans le cas de la fusion Lpp:OutB, la CTE aurait dû permettre de préserver la structure en triple hélice α de Lpp, tandis que la séquence CTE elle-même ne semble pas adopter une structure secondaire en hélice. Il est donc probable que le remplacement d'une séquence Lpp assez longue par celle d'OutB a provoqué la déstabilisation de la protéine chimérique. Même si *a*

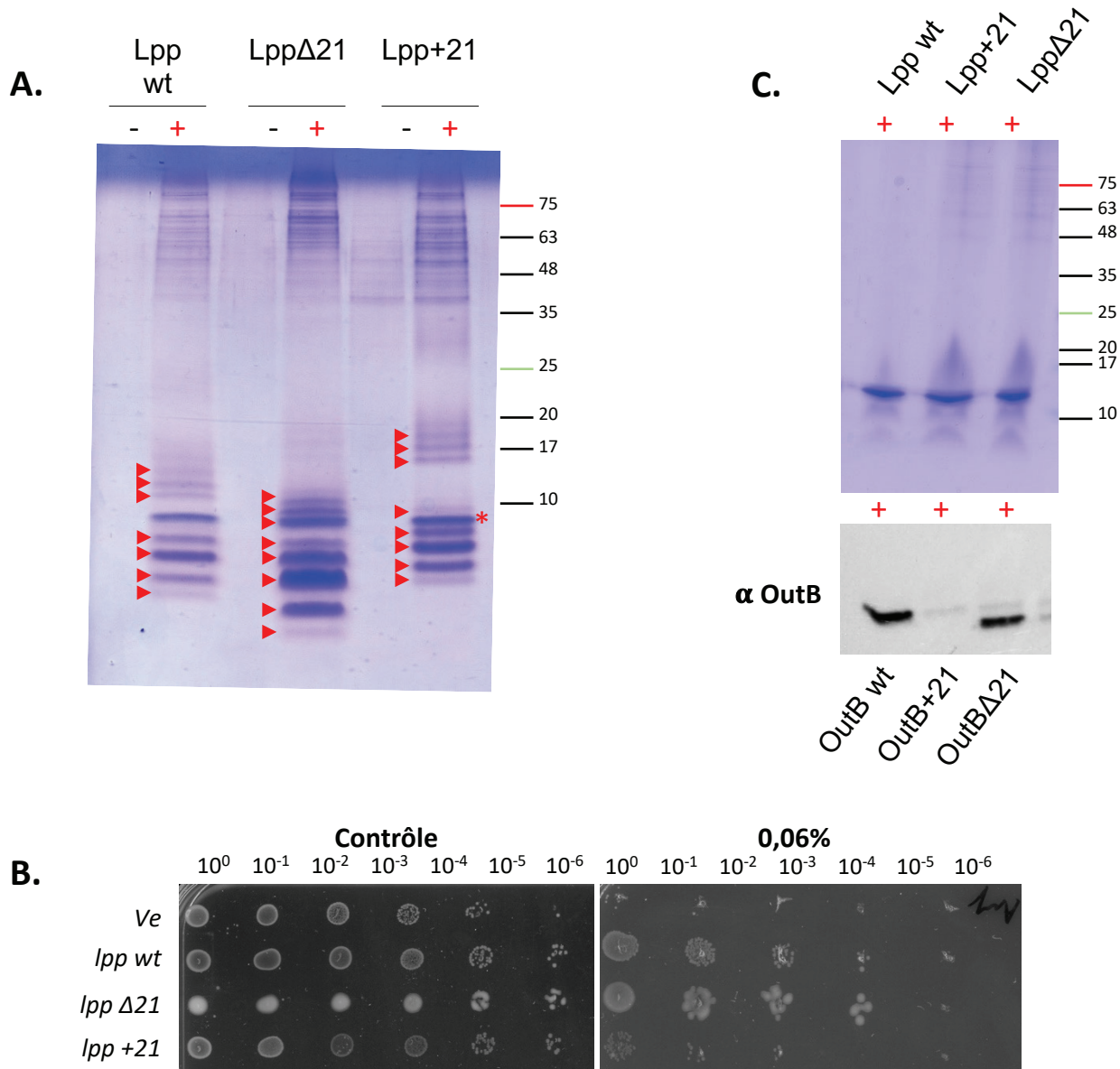


Figure 37. Evaluation du couplage des versions Lpp+21 et LppΔ21 au PG de *D. dadantii*. Le PG issu de la souche *lpp*⁻ de *D. dadantii* exprimant les versions Lpp+21 et LppΔ21 à partir de pGEM-T a été digéré au lysozyme et les protéines libérées ont été séparées sur gel SDS-PAGE (18 % tris-tricine), puis colorées au bleu de Coomassie (A). Les résultats montrent que la version allongée et la version raccourcie de Lpp sont couplées au PG car génèrent plusieurs formes Lpp-PG (flèches rouges). Le poids moléculaire apparent de ces formes change en accord avec la longueur de versions de Lpp. L'étoile rouge indique le lysozyme. **B. Test de sensibilité au SDS de la souche *D. dadantii* *lpp*⁻ exprimant Lpp+21 et LppΔ21 à partir de pGEM-T.** La souche exprimant LppΔ21 forme des colonies muqueuses. L'expression de LppΔ21 restaure la sensibilité au SDS de la souche *lpp*⁻ à un niveau similaire à celui avec Lpp wt (voir également Fig. 36.C). En revanche, l'expression de Lpp+21 ne complète pas aussi efficacement le mutant *lpp*. **C. Evaluation du couplage de Lpp et d'OutB lors de l'expression simultanée des versions allongées et raccourcies de ces deux protéines chez la souche *lpp* de *D. dadantii*.** Les versions Lpp wt, Lpp+21 et LppΔ21 ont été exprimées sur le pGEM-T respectivement avec les versions OutB wt, OutB+21 et OutBΔ21 exprimées sur pBAD. Le PG issu de ces souches a été digéré avec le lysozyme, puis analysé par coloration au bleu de Coomassie et par Western blot avec les anticorps dirigés contre OutB. Cette expérience a été réalisée afin de déterminer si le changement de taille de périplasme induit par Lpp d'une longueur variée influençait la capacité d'OutB à se lier au PG. Malheureusement, la présence simultanée des plasmides pGEM-T et pBAD au sein de *D. dadantii* *lpp*⁻ ne permet pas un niveau d'expression suffisant pour la détection convenable de Lpp et d'OutB.

posteriori, ces raisons semblent être assez évidentes, il nous a paru intéressant de tester cette possibilité.

3) La taille du périplasme impacte-t-elle la capacité d'OutB à se lier au PG ?

Il a récemment été montré que l'allongement de Lpp de 21 résidus, induisait non seulement l'élargissement du PG, mais également un phénomène compensatoire de repositionnement de la couche de PG (Mandela 2022). Plus spectaculaire encore, les variations de la taille du périplasme causées par un allongement ou raccourcissement de Lpp affectent la mise en place des protéines et des complexes multiprotéiques situés dans le périplasme, comme les flagelles et la lipoprotéine senseur de stress RcsF (Cohen *et al.* 2017; Hussein *et al.* 2018). Ainsi, nous avons voulu savoir si la modification de la taille du périplasme par le raccourcissement ou l'allongement de Lpp aurait un impact sur la capacité d'OutB à s'attacher au PG. Pour cela, nous avons construit une version de Lpp délétée de 21 résidus (Lpp Δ 21) ou une version de Lpp augmentée de 21 résidus (Lpp+21) (Fig. 35.A). Ces versions de *lpp* ont été clônées sur le plasmide pGEM-T sous contrôle du promoteur *P_{lac}*. Le taux de production de ces versions de Lpp est comparable à celui de la version sauvage de Lpp (Fig. 35.B). Les tests de sensibilité au SDS montrent que l'expression de ces versions de Lpp dans un mutant *lpp* de *D. dadantii* restaure la résistance au SDS, mais que la souche exprimant Lpp+21 est moins résistante que celle exprimant Lpp sauvage ou Lpp Δ 21 (Fig 36.C et 37.B). On peut noter que l'expression de ces versions de Lpp a engendré des phénotypes particuliers caractérisés par la formation de colonies muqueuses par la souche exprimant Lpp Δ 21, et des colonies plutôt « sèches » par la souche exprimant Lpp+21 (Fig. 37.B). L'analyse du PG issu du mutant *lpp* de *D. dadantii* exprimant ces versions de Lpp montre que celles-ci sont couplées au PG de façon covalente aussi efficacement que Lpp sauvage. Les formes de Lpp couplées au PG (Lpp-PG1 à 7, flèches rouges) similaires à celles de la souche sauvage sont visibles lors de la digestion du PG par le lysozyme (Fig. 37.A). De plus, en accord avec l'ajout ou la délétion de résidus, on peut remarquer que les formes de Lpp Δ 21 couplées au PG présentent un poids moléculaire plus petits que ceux de Lpp sauvage, tandis que ceux de Lpp+21 semblent être plus grands (Fig. 37.A). Par la suite, nous avons exprimé les variants OutB sauvage, OutB Δ 22 ou OutB+21 sur plasmide pBAD (conférant la résistance au chloramphénicol) dans un mutant *lpp* de *D. dadantii* complémenté avec le plasmide pGEM-T (Amp^R) portant Lpp sauvage, Lpp Δ 21 ou Lpp+21, afin de tester le couplage d'OutB chez les souches exprimant ces versions de Lpp (Fig. 37.C). Nous avons voulu savoir si la modification de la taille du périplasme par l'allongement ou le raccourcissement de Lpp (Mandela *et al.* 2022), permettrait toujours le couplage d'OutB au PG. Malheureusement, cette expérience n'a pas abouti à des résultats concluants étant donné que la cohabitation de deux plasmides dans la cellule ne permettait pas l'expression simultanée de Lpp et d'OutB en quantités suffisantes et de manière pérenne. En conséquence le PG purifié à partir de ces souches n'a pas permis de visualiser de manière claire le couplage de Lpp ni d'OutB (Fig. 37.C). Toutefois, la récente construction de mutants de *D. dadantii* portant sur le chromosome le gène *lpp* Δ 21 ou *lpp*+21 à la place de l'allèle sauvage de *lpp* permettra de poursuivre cet axe de recherche.

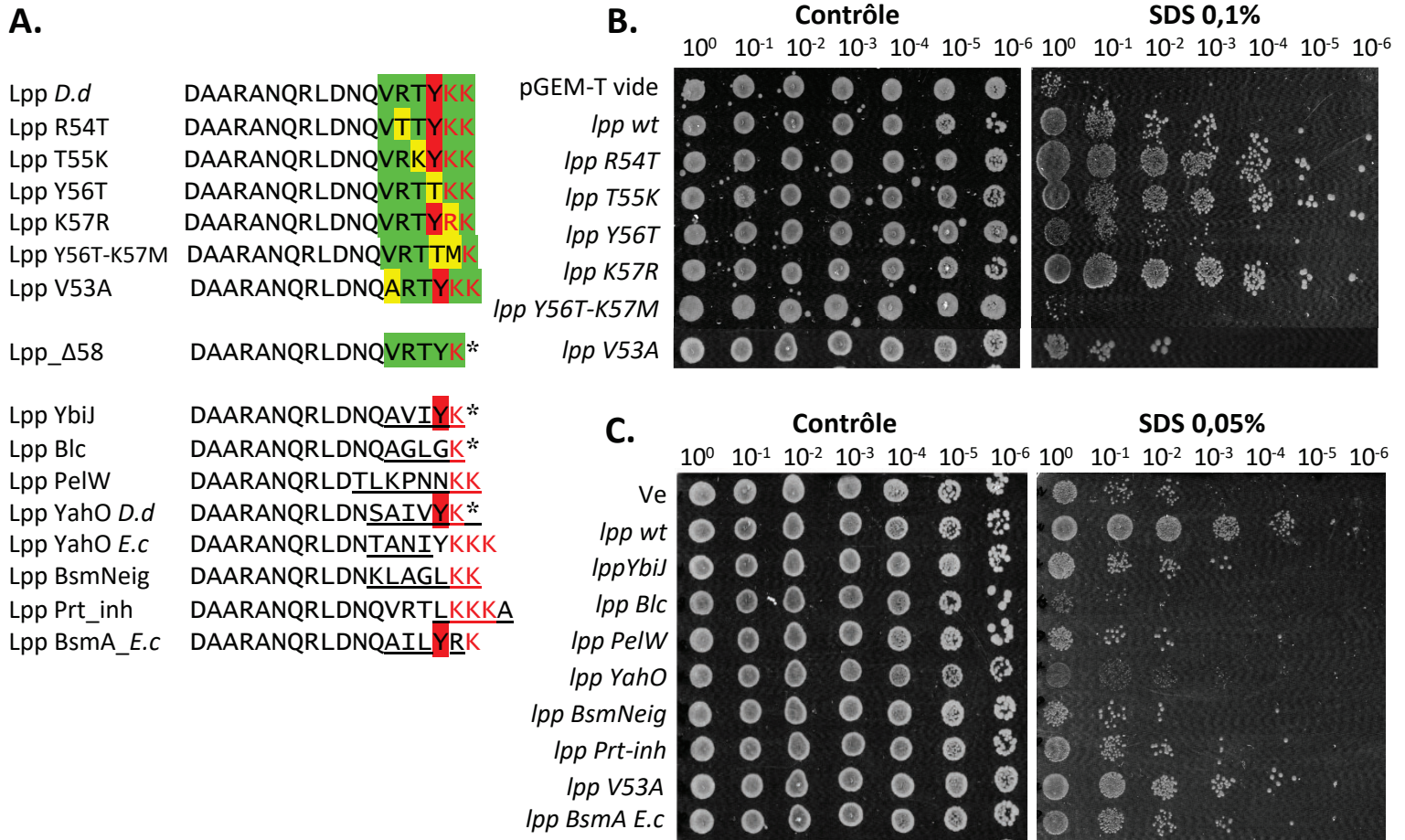


Figure 38. Mutagenèse dirigée de la Lpp-box de Lpp de *D. dadantii*. **A. Substitutions introduites dans la Lpp-box de Lpp de *D. dadantii*.** Les résidus de Lpp-box sont soulignés en vert. Les résidus substitués ou délétés sont surlignés en jaune. La version Lpp_Y56T mime la Lpp-box d'OutB. Le variant Lpp_Δ58 a été délété d'une lysine C-terminale. Les fusions Lpp YbiJ, Lpp-Blc, Lpp-PelW, Lpp-YahO, Lpp-Prt_inh, Lpp_BsmNeig ont été construites par mutagenèse dirigée afin d'évaluer le potentiel du couplage au PG de ces mêmes protéines. Les acides aminés substitués sont soulignés en noir. **B et C. Tests de sensibilité au SDS du mutant *lpp* de *D. dadantii* exprimant les versions de Lpp construites.** Les versions de Lpp présentées en panel A ont été exprimées sur plasmide pGEM-T dans la souche *lpp* de *D. dadantii*. Les bactéries ont été cultivées dans BL + Amp toute la nuit à 30°C, puis diluées (jusqu'à 10⁻⁷) et déposées en gouttes sur un milieu sans SDS (à gauche), ou avec du SDS à une concentration de 0,05% (à droite) et les boîtes ont été incubées pendant 48h à 30°C.

II) Résidus C-terminaux de la Lpp de *D. dadantii* indispensables à son couplage au PG

1) Mutagenèse dirigée des six résidus C-terminaux de Lpp de *D. dadantii*

La séquence des Lpp diffère sensiblement entre *E. coli* (ATKYRK) et *D. dadantii* (VRTYKK). En revanche, au sein de la même espèce, la forte similarité des Lpp-boxes de Lpp et d'OutB de *D. dadantii* (VRTYKK et VRTTKK respectivement) nous a laissé penser qu'il pouvait exister une Lpp-box propre à chaque espèce bactérienne, caractéristique des protéines couplées au PG. Ainsi, les expériences suivantes ont été menées dans le but de déterminer une potentielle séquence consensus de couplage au PG chez *D. dadantii*.

La mutagenèse de la région C-terminale d'OutB décrite plus haut (chapitre II, Fig. 32 et Fig. 33) a démontré que sa Lpp-box pouvait tolérer des substitutions assez importantes sans que son couplage au PG ne soit affecté. On peut donc raisonnablement supposer que le motif de couplage de Lpp de *D. dadantii* pourrait aussi être assez permissif et tolérer plus au moins bien la substitution de résidus situés à proximité de la lysine C-terminale. Or, il est beaucoup plus évident d'estimer d'une manière semi-quantitative l'efficacité de couplage au PG de formes mutées de Lpp, que celles d'OutB. En effet, en menant la mutagenèse plus au moins systématique de la région C-terminale de Lpp, nous avons tenté de définir une séquence consensus permettant le couplage de Lpp, et donc des autres protéines au PG (Fig. 38). Nous pensions, qu'une fois la séquence consensus connue, nous allions pouvoir rechercher *in silico* la présence d'un tel motif dans les protéines de *D. dadantii*, localisées ou exposées dans le périplasme et ensuite tester leur liaison covalente potentielle au PG. Pour déterminer une séquence consensus de la Lpp-box chez *D. dadantii*, nous avons décidé d'évaluer l'efficacité de couplage de variants de Lpp de *D. dadantii* ayant subi des mutations dans les six résidus C-terminaux (Fig. 38, 39, 40 et 41). Lpp est d'une part abondamment couplée au PG et on peut estimer assez précisément la baisse de l'efficacité de couplage d'une version Lpp mutée par SDS-PAGE et Western blot. D'autre part, Lpp est responsable de l'attachement de la ME au PG et son absence ou défaut de couplage provoque la déstabilisation de l'enveloppe. De cette façon l'efficacité de couplage de Lpp pouvait être aussi évaluée par des tests de sensibilité au SDS de la souche *lpp* de *D. dadantii* exprimant les variants de Lpp afin d'évaluer le niveau de la résistance au SDS conférée par ces variants. Tout d'abord, six variants de Lpp ont été construits : Lpp V53A, Lpp R54T, Lpp T55K, Lpp Y56T, Lpp K57R, Lpp Y56T_K57M (Fig. 38.A). Les tests de résistance au SDS montrent que la plupart des variants testés confèrent une résistance au SDS similaire à celle de Lpp sauvage, à l'exception du variant Lpp Y56T_K57M qui possède une sensibilité au SDS comparable à celle du mutant *lpp* avec le vecteur vide (Fig. 38.B). Le variant Lpp Y56T confère quant à lui une résistance intermédiaire au SDS (Fig. 38.B). La tyrosine⁵⁶ semble donc être un résidu important pour le couplage de Lpp au PG de *D. dadantii*.

Pour aller plus loin dans la caractérisation du couplage de Lpp, nous avons entrepris la construction d'autres versions de Lpp cumulant plusieurs modifications dans les trois résidus C-terminaux de la Lpp-box (Fig. 39.A). L'analyse de la production de ces versions de Lpp montre qu'elles sont toutes exprimées à un niveau similaire à celui de Lpp sauvage (Fig. 39.B). La mutagenèse d'OutB a démontré que le variant OutB_ΔK220 est toujours bien couplé au PG (chapitre II, Fig. 32.B). Nous avons donc construit un mutant équivalent de Lpp, Lpp_ΔK58 (Fig. 39.A). Bien que Lpp_ΔK58 ait

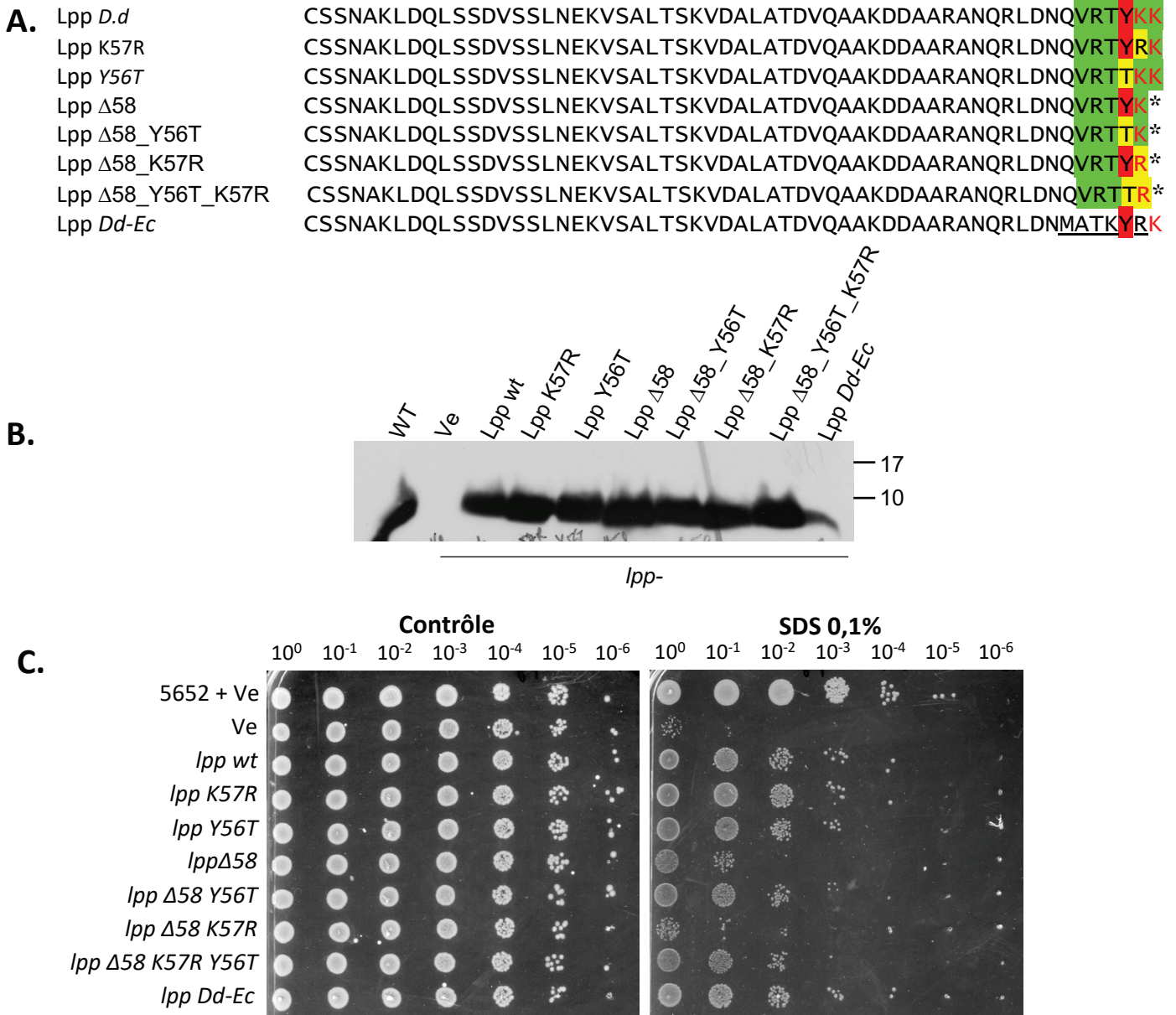


Figure 39. Mutagenèse dirigée de la Lpp-box de Lpp de *D. dadantii*. **A. Liste de variants de Lpp de *D. dadantii* portant des substitutions dans les trois derniers résidus.** Les résidus de Lpp-box sont soulignés en vert. Les résidus substitués ou délétés sont en rouge. Les résidus C-terminaux de Lpp d'*E. coli* (variant *Lpp_Dd-Ec*) sont soulignés en noir. **B. Analyse de production des versions de Lpp présentées dans le panel A.** Les versions de Lpp ont été exprimées à partir du plasmide pGEM-T dans un mutant *lpp* de *D. dadantii*. Les cellules ont été lysées dans le tampon de Laemmli et les extraits cellulaires ont été séparés sur gel SDS-PAGE (18 % tris-tricine) et analysés par Western blot avec les anticorps dirigés contre Lpp. Les résultats montrent que les versions de Lpp sont produites à un taux similaire à celui de Lpp wt, à l'exception de *Lpp_Dd-Ec*. **C. Tests de sensibilité au SDS du mutant *lpp* de *D. dadantii* exprimant les versions de Lpp.** Les versions de Lpp ont été exprimées à partir du plasmide pGEM-T dans la souche *lpp* de *D. dadantii*. Les bactéries ont été cultivées dans BL + Amp toute la nuit à 30°C, puis diluées (jusqu'à 10⁻⁷) et déposées en gouttes sur un milieu sans SDS (à gauche), ou avec du SDS à une concentration de 0,1% (à droite) et les boîtes ont été incubées pendant 48h à 30°C.

restauré partiellement la résistance au SDS d'une souche *lpp*- de *D. dadantii* (Fig. 39.C), ce variant n'a pas été visible sur le SDS-PAGE coloré au Bleu de Coomassie (Fig. 40.B). Cependant, des quantités très faibles des formes de Lpp_Δ58 couplées aux résidus de PG ont été visualisées par Western blot (Fig. 40.C). Ces résultats sont surprenants vu que le variant OutBΔ220 (OutB_K220tga) a été couplée au PG avec la même efficacité qu'OutB sauvage (Fig. 32.B). Comme la seule différence entre la Lpp-box de Lpp et OutB réside dans l'antépénultième résidu, Tyr vs Thr, nous avons donc substitué la tyrosine⁵⁶ de Lpp_ΔK58 par une thréonine (Lpp_ΔK58_Y56T). Le variant Lpp_ΔK58_Y56T n'a pas été détectable sur gel coloré au bleu de Coomassie (Fig. 40.B) mais des formes couplées sont visibles en Western blot (Fig. 40.C). Néanmoins, la quantité apparente de Lpp_ΔK58_Y56T couplée aux PG est moins importante que celles de Lpp_ΔK58 (Fig. 40.C). En revanche, l'expression de Lpp_ΔK58_Y56T confère à la souche *lpp* de *D. dadantii* une résistance au SDS supérieure à Lpp_ΔK58 et comparable à celle de Lpp sauvage, et (Fig. 39.C).

Par la suite, nous avons construit une version Lpp K57R mimant le C-terminus de Lpp d'*E. coli* (Fig. 38. A et 40.A). L'analyse du PG en Western blot montre que ce variant est couplé à un taux similaire à Lpp sauvage de *D. dadantii* (Fig. 40.A), et qu'il confère une résistance au SDS similaire à cette dernière (Fig. 38.B et 39.C). En revanche, la délétion de la lysine C-terminale dans la version Lpp_ΔK58_K57R (Fig. 39. A et 40.A) abolit le couplage au PG car aucune trace de ce variant n'est visible en bleu de Coomassie, ni en Western blot (Fig. 40.B et 40.C). En accord avec ces résultats, cette version de Lpp ne permet pas de restaurer la résistance au SDS (Fig. 39.C). Curieusement, la substitution simultanée de la tyrosine en thréonine dans la version Lpp_ΔK58_K57R (ce qui a généré la version Lpp_ΔK58_Y56T_K57R) (Fig. 39.A) restaure en partie le couplage de ce dernier variant au PG (Fig. 40.C), et restaure partiellement la résistance au SDS (Fig. 39.C). Ce dernier résultat est tout à fait surprenant puisque ce variant Lpp_ΔK58_Y56T_K57R ne porte aucune lysine dans ou proche de l'extrémité C-terminale, et suggère que Lpp_ΔK58_Y56T_K57R pourrait être liée par son arginine C-terminale. Or, chimiquement le groupe guanidine de l'arginine semble être assez différent de la chaîne latérale de la lysine. En complément de ces expériences, nous avons construit une version de Lpp de *D. dadantii* portant les sept résidus C-terminaux de Lpp d'*E. coli*, Lpp_Dd-Ec (Fig. 39.A). Cette version restaure la résistance au SDS dans une souche *lpp* de *D. dadantii* à un niveau similaire à Lpp sauvage (Fig. 39.C). En accord avec ces résultats, l'analyse du PG par gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie montre que Lpp_Dd-Ec est couplée au PG aussi efficacement que Lpp elle-même (Fig. 41.A).

2) Mutagenèse dirigée permettant à Lpp de mimer l'extrémité C-terminale de protéines candidates

En parallèle, la recherche *in silico* d'un motif C-terminal (KK, YK, ou KKK) parmi les protéines périplasmiques de *D. dadantii* nous a permis d'identifier quelques protéines potentiellement liées au PG de *D. dadantii*, dont huit présentes chez *D. dadantii* et *Pectobacterium* (Ybij, Blc, PelW, YahO, BsmA, BsmNeig, Prt-Inh et PaeX). Ces protéines possèdent un ou plusieurs résidus de lysine dans leur extrémité C-terminale (Fig. 38.A). Les séquences C-terminales de ces protéines ont été fusionnées à Lpp et leur couplage a tout d'abord été testé par test de résistance au SDS. Les résultats montrent que

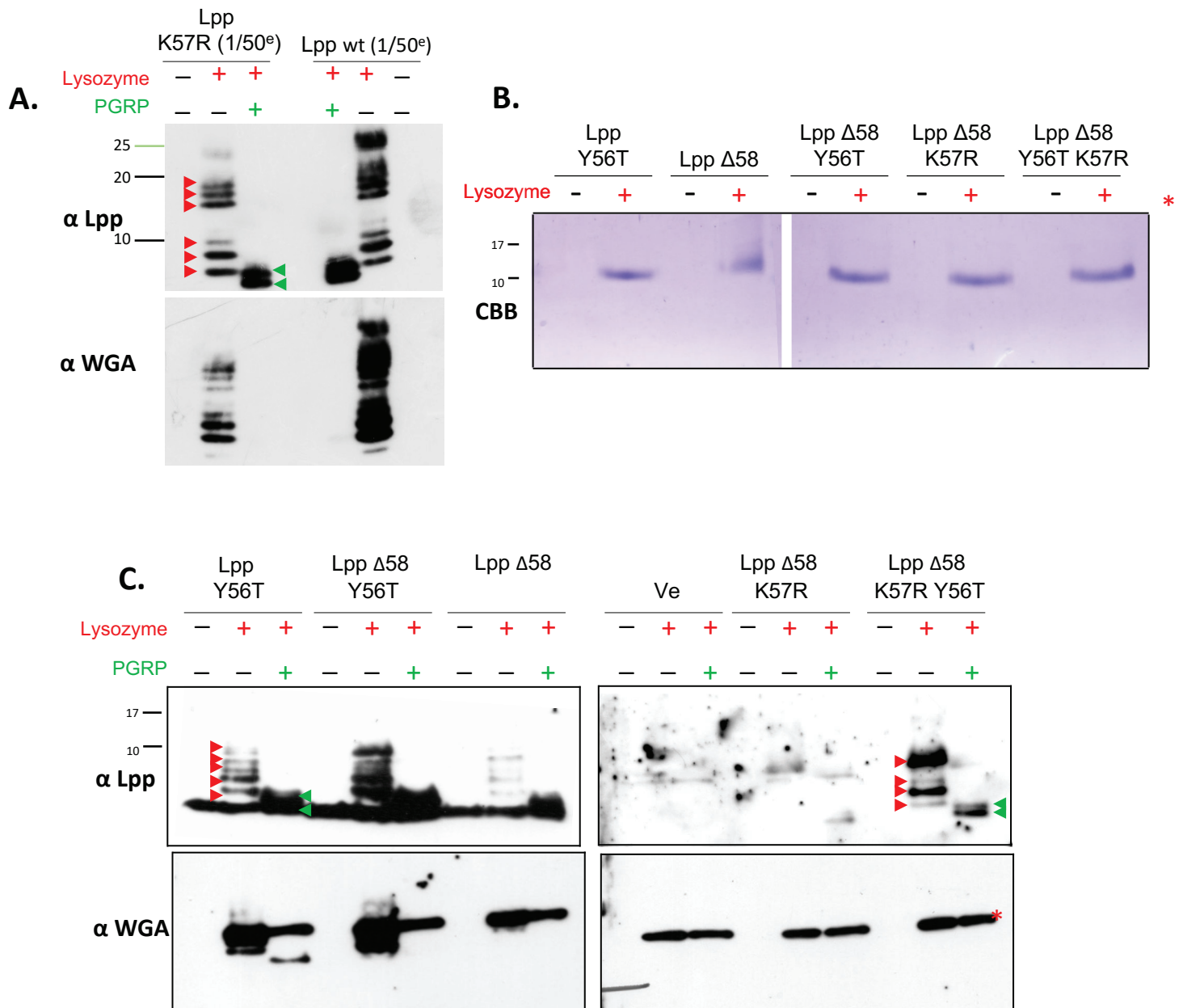


Figure 40. Analyse du couplage des versions Lpp au PG chez *D. dadantii*. Les versions de Lpp ayant subi une mutagenèse de la Lpp-box (présenté en Fig. 39.A) ont été exprimées chez le mutant *lpp* de *D. dadantii* (présenté en Fig. 39.B). Le PG de ces souches a été purifié et digéré par le lysozyme. Les protéines libérées par l'action du lysozyme ont été séparées sur gel (18 % tris-tricine), puis colorées au bleu de Coomassie, ou analysées par Western blot avec les anticorps anti-Lpp. **A. La version Lpp_K57R est couplée au PG à un niveau similaire à celui de Lpp wt.** Les deux échantillons de PG ont été dilués 50 fois après digestion afin de pouvoir nettement distinguer les bandes protéiques correspondant à Lpp-PG. **B. Les autres versions de Lpp ne sont pas détectables dans le PG par coloration au bleu de Coomassie.** L'analyse du PG des souches exprimant Lpp_Y56T, Lpp_Δ58, LppΔ58-Y56T, Lpp_Δ58-K57R et Lpp_Δ58-K57R-Y56T montre que ces versions ne sont pas couplées au PG à un taux aussi important que Lpp wt ou Lpp_K57R. **C. L'analyse du PG par Western blot révèle la présence de formes de Lpp couplées au PG.** L'analyse par Western blot de mêmes échantillons de PG que dans le panel B révèle la présence de formes de Lpp mutées couplées au PG. De façon spectaculaire, la version Lpp_Δ58-K57R-Y56T est couplée au PG plus efficacement que les versions Lpp_Δ58 et Lpp_Δ58-Y56T. L'étoile rouge indique le lysozyme.

les variants Lpp portant les motifs C-terminaux de Blc, YahO_{D.d}, BsmNeig ne restaurent pas la résistance au SDS, indiquant que ces motifs ne permettent pas le couplage de Lpp au PG. En revanche, les variants Lpp_PelW, Lpp_Prt_inh, Lpp_BsmA_{E.coli}, et Lpp_YbiJ restaurent la résistance au SDS du mutant *lpp* de *D. dadantii*, ce qui indique que ces variants pourraient être liés au PG de manière covalente (Fig. 38.B).

Afin de vérifier l'efficacité de couplage de ces variants de Lpp au PG, nous avons analysé par gel SDS-PAGE le PG issu des souches les exprimant. Les résultats de gels colorés au bleu de Coomassie montrent que les variants Lpp_YbiJ et Lpp_*E. coli* sont couplées au PG de *D. dadantii* dans des quantités similaires à celle de Lpp sauvage, tandis que Lpp_BsmA_{E.coli} est couplée en moindre quantité (Fig. 41.A). Les variants Lpp_YahO, Lpp_Blc et Lpp_BsmNeig ne sont pas couplés au PG en Western blot (Fig. 41.B). De manière surprenante, les variants de Lpp portant les motifs C-terminaux de PelW, PrtInh ne sont pas non plus visibles au bleu de Coomassie. Afin d'augmenter la sensibilité de détection des formes potentielles de Lpp couplées au PG, nous avons analysé ces échantillons par Western blot avec les anticorps dirigés contre Lpp. Cette approche a été fructueuse, puisque des formes de Lpp couplées sont visibles chez les variants Lpp_BsmNeig, Lpp_PelW, Lpp_PrtInh, Lpp_YahO_{E.coli}, mais pas chez le mutant *lpp*, ni les variant Lpp_YahO_{D.d} et Lpp_Blc (Fig. 41.B). Toutefois ces formes de Lpp sont couplées au PG à un taux au moins cent fois inférieur à celui de Lpp sauvage, puisque l'intensité des formes couplées du témoin Lpp sauvage dilué 50 fois est deux fois supérieure à la réponse obtenue avec les variants de Lpp (Fig. 41.B).

III) Evaluation du couplage covalent des protéines candidates identifiées

Nous avons ensuite cherché à mettre en évidence le couplage potentiel de quelques-unes des protéines natives au PG. Pour cela les gènes *BsmA*_{E.coli}, *BsmA*_{D.d}, *YbiJ*_{E.coli}, *YbiJ*_{D.d}, *YahO*_{E.coli} et *YahO*_{D.d} ont été clônés dans un plasmide, puis exprimés dans le mutant *lpp* de *D. dadantii* pour extraire ensuite le PG. Comme nous ne possédions pas d'anticorps dirigés contre ces protéines, nous avons analysé les échantillons de PG par Western blot avec WGA ou par une coloration au nitrate d'argent, plus sensible que la coloration au bleu de Coomassie (Fig. 41.C). Malheureusement, les résultats obtenus n'ont pas permis de déterminer de manière concluante la présence de ces protéines au PG. Une approche supplémentaire a consisté à l'ajout d'une étiquette polyhistidine au sein des séquences des protéines. Malheureusement, les protéines ainsi taguées n'ont pas pu être détectées avec le Ni-NTA-HRP.

Les résultats de la mutagenèse de la région C-terminale de Lpp ont démontré que le motif du couplage de Lpp de *D. dadantii* au PG peut tolérer des substitutions assez importantes sans que le couplage soit trop affecté. Par ailleurs, certaines substitutions assurent un couplage au PG intermédiaire ou un peu moindre de variants de Lpp en question. Vue une telle variabilité potentielle de la Lpp-box, il nous semble être assez difficile de trouver *in silico* les protéines-candidates valables, potentiellement couplées au PG. En effet, on ne peut pas exclure, qu'en plus des protéines membranaires situées soit dans la ME (comme Lpp ou les porines) ou dans la MI (comme OutB), certaines protéines périplasmiques soient elles aussi être couplées au PG. Or, une analyse

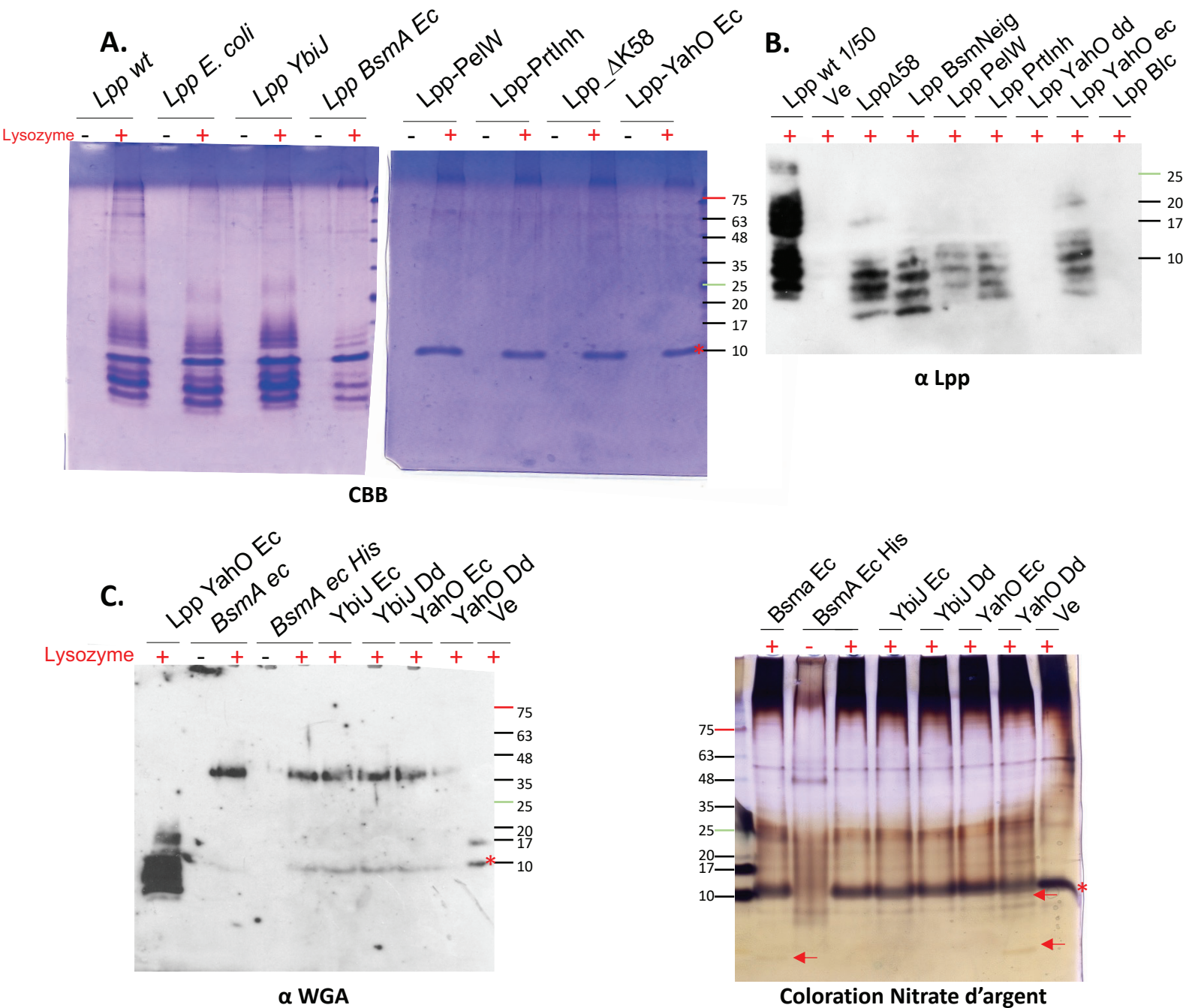
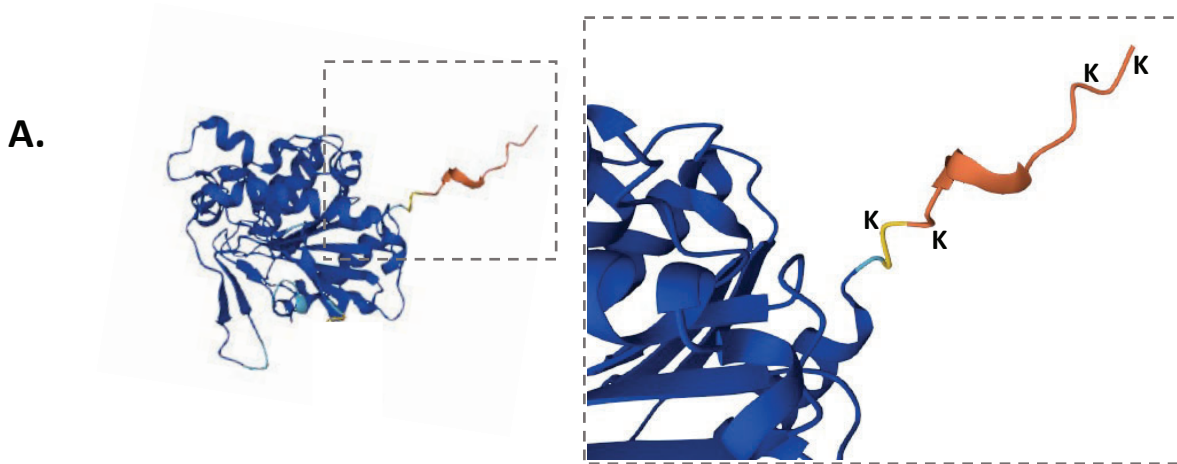


Figure 41. Analyse du couplage des versions Lpp portant l'extrémité C-terminale des protéines potentiellement couplées au PG. Les versions de Lpp ayant subi une mutagenèse au niveau de la Lpp-box ont été exprimées chez le mutant *lpp* de *D. dadantii*. Le PG de ces souches a été purifié et digéré par le lysozyme. Les protéines ainsi libérées ont été séparées sur gel (18 % tris-tricine), puis colorées au bleu de Coomassie, ou analysées par Western blot avec les anticorps anti-Lpp. Le couplage au PG versions Lpp_E.coli, Lpp_YbiJ et Lpp-BsmA est visible en coloration au bleu de Coomassie, à un niveau similaire à celui de Lpp wt (A). En revanche, le couplage des versions Lpp_PelW, Lpp-Prtlnh, Lpp-YahOec et Lpp_BsmNeig est visible en Western blot avec les anticorps anti-Lpp. Lpp_YahOdd et Lpp_Blc ne sont pas couplées au PG (B). L'échantillon Lpp wt a été dilué 50 fois. C. **Evaluation du couplage des protéines identifiées au PG.** Les gènes des protéines-candidates ont été clônés dans le vecteur pGEM-T. Les protéines ont été exprimées chez le mutant *lpp* de *D. dadantii* et le PG a été extrait, puis digéré par le lysozyme. Les protéines libérées ont été analysées par Western blot avec les anticorps WGA (à gauche) afin de déterminer la présence de résidus couplés au PG, ou colorées au nitrate d'argent (à droite). Malheureusement, aucune forme de ces protéines couplées au PG n'a pu être détectée.

systématique de la composition en acides aminés des protéines cytoplasmiques et périplasmiques d'*E. coli* a démontré que la lysine C-terminale est surreprésentée dans les protéines périplasmiques car retrouvé dans plus de 20% de toutes les protéines périplasmiques (Kim *et al.* 2018). Enfin, un exemple de la lipoprotéine LimB de *C. burnetii*, montre que certaines protéines peuvent être couplées au PG via une lysine interne, située à l'intérieur de la chaîne polypeptidique (Sandoz *et al.* 2021). Cependant, nous avons voulu explorer cette hypothèse en prenant comme exemple la pectine acétyl-estérase PaeX de *D. dadantii* (Shevchik et Hugouvieux-Cotte-Pattat 2003) (Fig. 42.A). PaeX est localisée dans le périplasme où elle effectue la déestérification des oligomères pectiques générés dans le milieu externe par les pectate lyases sécrétées. PaeX (300 résidus) est composée d'un domaine globulaire bien structuré qui possède une extension C-terminale de 15 résidus portant une paire de lysines en extrémité C-terminale et une autre paire de lysines située un peu plus loin (Fig. 42. A et 42.B). Cette topologie reflète celle du domaine HR d'OutB suivi d'une extension C-terminale. L'expression de *paeX* est induite en présence de la pectine, mais la quantité de PaeX dans les cellules de *D. dadantii* (détectée avec les anticorps dirigés contre PaeX) n'est pas très élevée. Ainsi, nous n'avons pas pu détecter PaeX dans le PG de la souche sauvage de *D. dadantii*. Afin d'augmenter la quantité de la protéine, *paeX* a été exprimé à partir d'un plasmide chez *D. dadantii*. Le PG issu de cette souche a contenu une quantité importante de PaeX « piégée » et sa digestion par le lysozyme a causé l'apparition d'une bande supplémentaire, située au-dessus de PaeX (Fig. 42.C). Le traitement du PG avec l'amidase PGRP a provoqué la disparition de cette forme supplémentaire (Fig. 42.C). Avec un certain degré de précaution, on peut donc attribuer cette bande supplémentaire à une forme de PaeX couplée au résidu de PG (PaeX-PG). Afin de tester cette hypothèse et déterminer quelle lysine de PaeX serait impliquée dans le couplage au PG, nous avons réalisé la mutagenèse dirigée de quatre résidus de lysine situés dans l'extension C-terminale de PaeX (Fig. 42.B). Le Western blot montrent que le variant PaeX_K321tga ne produit plus la forme supplémentaire, éventuelle PaeX-PG (Fig. 42.C). Ces résultats suggèrent donc que PaeX serait couplée au PG via une de deux lysines C-terminales. Toutefois, ces résultats restent assez vagues et incertains et devront être reproduits avec une meilleure qualité.

IV) L,D-transpeptidases de *D. dadantii* impliquées dans le couplage covalent d'OutB et de Lpp au PG

L'analyse du chromosome de *D. dadantii* 3937 a révélé la présence de 4 gènes codant pour des protéines de la famille YkuD, qui pourraient être des L,D-transpeptidases ou des L,D-endopeptidases putatives : ABF-0016403, ABF-0020084, ABF-0020070 et ABF-0046523, respectivement nommées ci-après Ldt03, Ldt84, Ldt70 et Ldt523. La comparaison des séquences de ces protéines avec les six L,D-transpeptidases d'*E. coli* (LdtA (ErfK), LdtB (YbiS), LdtC (YcfS), LdtD (YcbB), LdtE (YnhG) et LdtF (YafK)) a révélé que Ldt03 et Ldt84 sont plus proches des LdtA, LdtB et LdtC, qui sont impliquées dans l'attachement de Lpp au PG (Fig. Annexe 2, 3, 4 et 5). Plus précisément, Ldt03 partage ~60 % d'identité avec LdtA et LdtB, tandis que LdtC partage 58 % d'identité avec Ldt84 et les deux protéines portent un motif LysM N-terminal. L'analyse des résidus à proximité de la cystéine catalytique de ces Ldts révèle que Ldt03 possède une triade dans le site catalytique CVR, comme son homologue chez *E. coli*, LdtB (YbiS) (Fig. Annexe 2A). Ldt84 possède une triade dans le site catalytique CIR, comme LdtC (YcfS), LdtE



B.

PaeX	LPAAIWPQLLDNWLTS	<u>LPL</u> ³¹² <u>KK</u> NNTANQPDKK ³²²
PaeX_321tga	LPAAIWPQLLDNWLTS	<u>LPL</u> <u>KK</u> NNTANQPDK*
PaeX_K312Y	LPAAIWPQLLDNWLTS	<u>LPL</u> <u>Y</u> KNNTANQPDKK
PaeX_K313A	LPAAIWPQLLDNWLTS	<u>LPL</u> <u>K</u> ANNTANQPDKK
PaeX_322tga	LPAAIWPQLLDNWLTS	<u>LPL</u> <u>KK</u> NNTANQPDK*

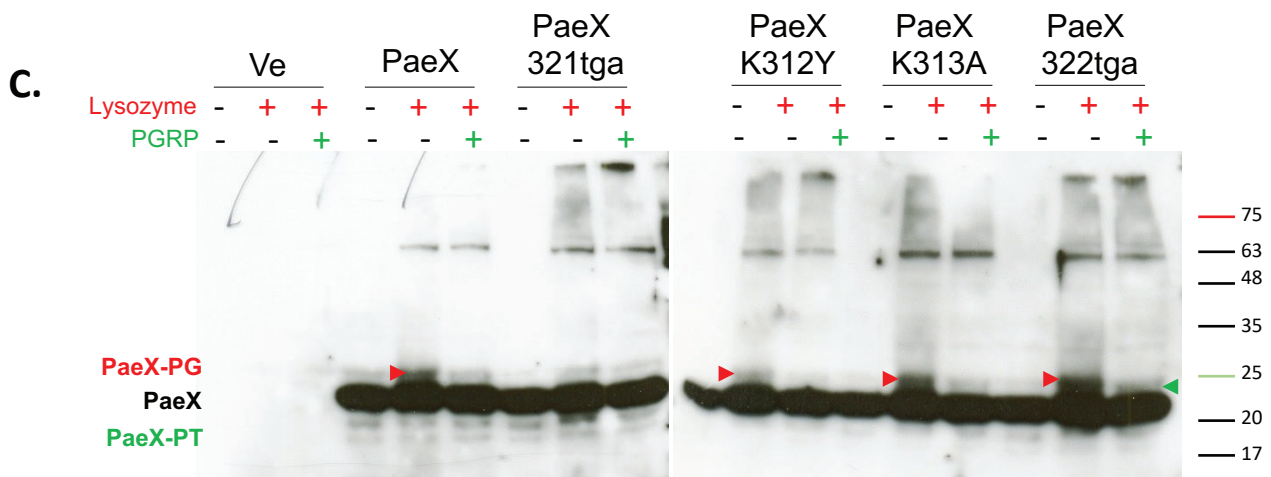


Figure 42. Analyse du couplage de PaeX au PG chez *D. dadantii*. **A. Structure de PaeX (modèle AlphaFold).** L'extension C-terminale de PaeX est en orange et jaune. L'emplacement des résidus de lysine est indiqué. **B. Séquence C-terminale de PaeX et de ses variants mutés.** L'extension C-terminale est soulignée en jaune avec les résidus de la lysine en rouge. **C. PaeX et ses variants ont été exprimés à partir du plasmide chez *D. dadantii*.** Le PG issu de ces bactéries a été digéré avec le lysozyme ou l'amidase PGRP. Les échantillons ont été séparés en SDS-PAGE et analysés par Western avec les anticorps dirigés contre PaeX. Les formes supplémentaires de PaeX apparues après la digestion enzymatique du PG et présumées être couplées aux résidus de PG sont indiquées avec des flèches rouges et vertes.

(YnhG) et LdtA (ErfK) (Fig. Annexe 2A). Par ailleurs, Ldt70 semble être un orthologue de LdtD (YcbB), qui est responsable du couplage alternatif 3→3 de peptides-tiges chez *E. coli* (Magnet *et al.* 2008). En effet, Ldt70 et LdtD (YcbB) partagent ~50% d'identité et la même organisation structurale : en plus du domaine catalytique YkuD, elles possèdent un domaine additionnel de liaison au PG (PF01471) et un domaine d'échafaudage (voir chapitre 'Structure et domaine des Ldts'). La triade dans le site catalytique de Ldt70 présente les résidus CVR, tout comme LdtD (YcbB) (Fig. Annexe 2A). Ldt523 quant à elle est similaire à YafK (LdtF), qui a récemment été renommée DpaA (peptidoglycan meso-diaminopimelic acid protein amidase A), la L,D-endopeptidase responsable du découplage de Lpp au PG d'*E. coli* (Bahadur *et al.* 2021). Cela est d'autant plus probable puisque le site catalytique de Ldt523 contient un résidu alanine (CYA) caractéristique des L,D-endopeptidases comme LdtF (YafK) (Winkle *et al.* 2021) (Fig. Annexe 2A), alors que les autres enzymes de la famille YkuD identifiées chez *D. dadantii* possèdent une arginine en deuxième position après la cystéine catalytique (CVR ou CIR) caractéristique des L,D-transpeptidases. En revanche, LdtE (YnhG) ne possède pas d'orthologue chez *D. dadantii*, mais curieusement, *ldtE* partage les mêmes gènes adjacents que *ldt84*, dont *lpp*. Cela est d'autant plus étonnant puisque LdtE (YnhG) réalise le couplage 3→3 de peptides-tiges (comme LdtD (YcbB) (Magnet *et al.* 2008) tandis que Ldt84 (comme vous pourrez le voir plus loin) effectue l'attachement covalent de Lpp au peptide-tige. A part *ldt84*, aucun autre gène *ldt* de *D. dadantii* ne partage de synténie avec un gène *ldt* d'*E. coli*.

1) [Identification des Ldts responsables du couplage de Lpp chez *D. dadantii*](#)

Afin de déchiffrer le rôle exact de chaque protéine de la famille YkuD de *D. dadantii*, et notamment identifier la ou les Ldts responsables du couplage de Lpp et d'OutB au PG, nous avons construit des souches de *D. dadantii* portant des mutations simples ou multiples des quatre gènes *ldt*. Pour cela, chacun des gènes *ldt* de *D. dadantii* a été amplifié puis cloné dans un plasmide. Un gène de résistance à un antibiotique (différent pour chaque *ldt*) a été inséré dans chaque gène *ldt* et ces constructions ont été recombinées par recombinaison homologue dans le chromosome de *D. dadantii*. Pour construire les souches portant les mutations doubles et triples, les mutations *ldt* individuelles ont été transduites grâce au phage transducteur ϕ EC2.

Afin de tester l'implication de Ldt putatives de *D. dadantii* dans le couplage de Lpp au PG, des tests de sensibilité des mutants *ldt* au SDS ont été réalisés (Fig. 43). Les études réalisées chez *E. coli* ont montré que l'absence de couplage covalent de Lpp au PG chez les mutants *ldt* peut engendrer une sensibilité accrue au SDS comme cela est le cas chez un mutant *lpp* (Fig. 43) (Mathélié-Guinlet *et al.* 2020). Les résultats des tests montrent que les souches de *D. dadantii* portant une mutation simple *ldt03*, *ldt84*, *ldt70* ou *ldt523* possèdent une résistance au SDS comparable à celle de la souche sauvage (Fig. 43). De même, les doubles mutants *ldt03/ldt70*, *ldt84/ldt70*, *ldt03/ldt523*, *ldt84/ldt523* et *ldt70/ldt523* se comportent également comme la souche sauvage (Fig. 43). En revanche, les mutants *ldt03/ldt84*, *ldt03/ldt84/ldt523* et *ldt03/ldt84/ldt70* présentent un défaut de croissance en présence de SDS (Fig. 43). Ce résultat suggère que Ldt03 et Ldt84 seraient responsables du couplage de Lpp au PG mais pas Ldt70 et Ldt523. D'autre part, ces résultats suggèrent que l'activité des Ldt03 et Ldt84 est redondante, puisque la présence d'une seule de ces Ldt dans la cellule permet de stabiliser l'enveloppe

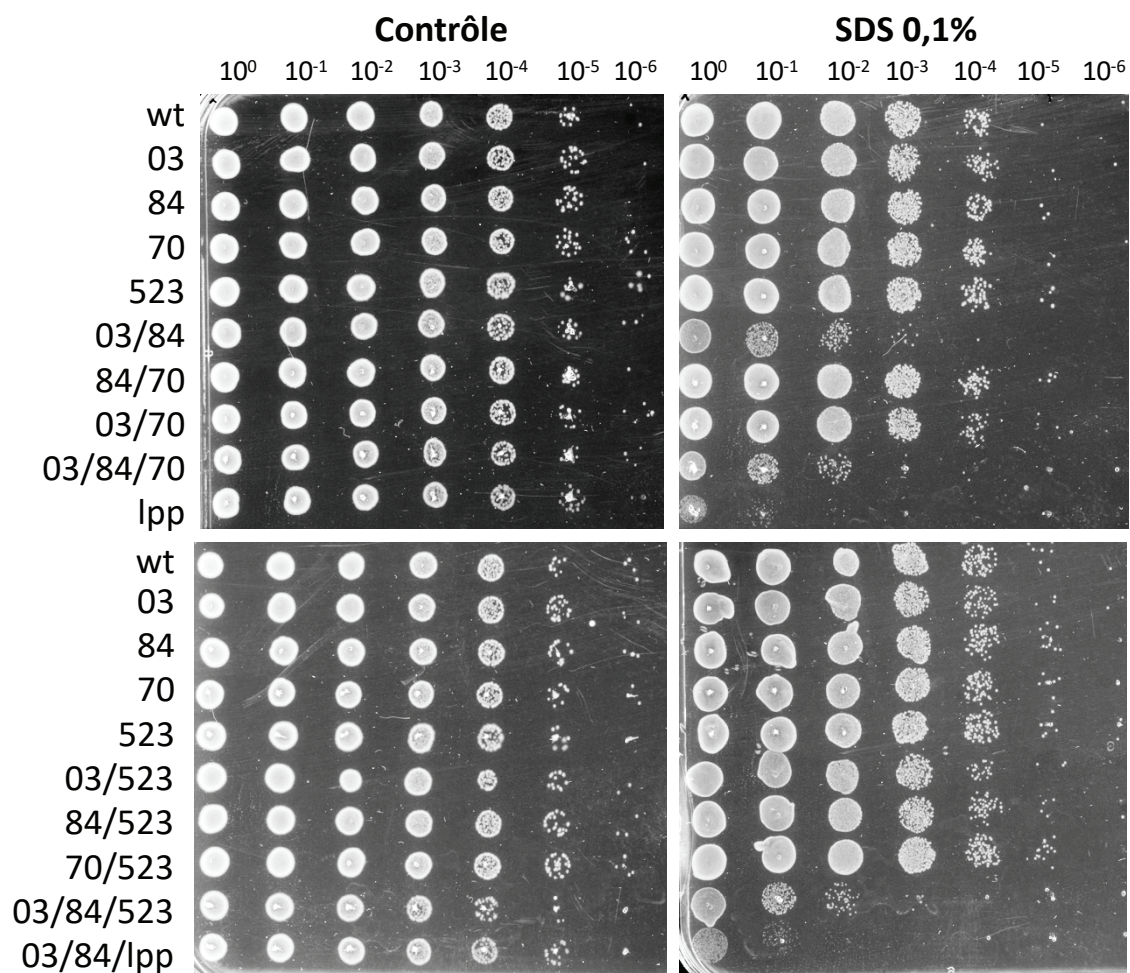


Figure 43. Test de résistance au SDS des souches *D. dadantii* mutées d'un ou de plusieurs gènes *ldt*.

Les souches de *D. dadantii* mutées de gènes *ldt* ou *lpp* ont été cultivées dans BL toute la nuit à 30°C, puis les cultures ont été diluées (jusqu'à 10^{-7}) et déposées en gouttes sur un milieu sans SDS (à gauche), ou avec du SDS à une concentration de 0,1% (à droite). Les boîtes ont été incubées pendant 48h à 30°C.

de *D. dadantii* (Fig. 43). Par ailleurs, on peut noter que le double mutant *ldt03/ldt84* est moins sensible au SDS que le mutant *lpp*, ce qui suggère que les formes de Lpp interagissant de manière non-covalentes avec le PG stabilisent en partie l'enveloppe du mutant *ldt03/ldt84* de *D. dadantii* (Fig. 43).

Afin de visualiser plus précisément l'action de chaque Ldt de *D. dadantii* sur le couplage de Lpp, le PG de chaque souche mutante a été extrait, puis digéré avec le lysozyme. Les profils des formes de Lpp ainsi générées ont été observés par gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie, puis par Western blot avec les anticorps anti-Lpp ou avec WGA (Fig. 44). L'analyse des souches mutées pour un seul gène *ldt* a démontré des changements de profil considérables du PG chez les mutants *ldt03* et *ldt84* (Fig. 44). Notamment, les deux formes majeures de Lpp observées dans la souche sauvage (Lpp-PG2 et Lpp-PG4) sont significativement moins abondantes dans les souches *ldt03* et *ldt84*, respectivement (Fig. 44.A). Ces altérations coïncident avec la disparition des formes de Lpp minoritaires de poids moléculaire plus élevé (Lpp-PG5 et Lpp-PG6) dans les mutants *ldt03* et *ldt84*, respectivement (Fig. 44.A). Ces modifications de profils de Lpp sont spécifiques à chacune de ces deux mutations et l'augmentation du temps de l'action du lysozyme de 3 à 24 heures ne change pas les profils observés (Fig. Annexe 1). En revanche, aucune altération des profils de Lpp n'est visible chez le mutant *ldt70*, ce qui suggère qu'elle n'est pas impliquée dans l'attachement de Lpp au PG (Fig. 44.A). En accord avec cette hypothèse, les profils observés dans les doubles mutants *ldt03/ldt70* ou *ldt84/ldt70* sont identiques à ceux des simples mutants *ldt03* et *ldt84* respectivement. De plus, en cohérence avec l'homologie de la séquence de Ldt523 avec YafK (LdtF ou DpaA), celle-ci serait effectivement une L,D-endopeptidase, puisque la mutation du gène *ldt523* semble provoquer une certaine augmentation de la quantité de Lpp couplée au PG (Fig. 44. A et 44.B). En revanche, le résultat le plus spectaculaire est qu'aucun dérivé de Lpp n'est observable dans le double mutant *ldt03/ldt84*, ni dans le triple mutant *ldt03/ldt84/ldt70* (Fig. 44.A). Ces résultats démontrent que Ldt03 et Ldt84 sont effectivement impliquées dans le couplage de Lpp au PG, mais que Ldt70 et Ldt 523 ne le sont pas. De plus, l'effet que l'absence de *ldt03* et *ldt84* génère des profils Lpp-PG différents suggère que les Ldt03 et Ldt84 pourraient avoir une spécificité particulière vis-à-vis du site de couplage.

Afin de vérifier cette hypothèse, le double mutant *ldt03/ldt84* a été complété avec un plasmide portant le gène *ldt03* ou *ldt84* (Fig. 46.A). Comme attendu, l'expression ectopique de *ldt03* ou *ldt84* a généré des profils de couplage de Lpp différents, similaires à ceux générés par les simples mutants (Fig. 44.A). Plus précisément, la complémentation du double mutant avec *ldt03* génère le profil de digestion du PG propre à la souche mutée de *ldt84*, et inversement (Fig. 44. A et 45.A). De plus, l'action de PGRP génère deux formes de Lpp-PG (Lpp-PT1 et PT2), dont la forme Lpp-PT1 est plus abondante avec le PG de la souche exprimant Ldt03, tandis que Lpp-PT2 est plus abondante avec Ldt84 (Fig. 48.D). Ces résultats supportent donc davantage l'hypothèse proposant que Ldt03 et Ldt84 possèdent une spécificité de site de couplage de Lpp au PG.

2) [L'expression de Ldt84 est toxique dans certaines conditions](#)

Dans la majorité des expériences décrites ci-dessus, les gènes d'intérêt ont été exprimés sur le plasmide pGEM-T (Promega), qui possède le gène *blaM* conférant la résistance à l'ampicilline. Le

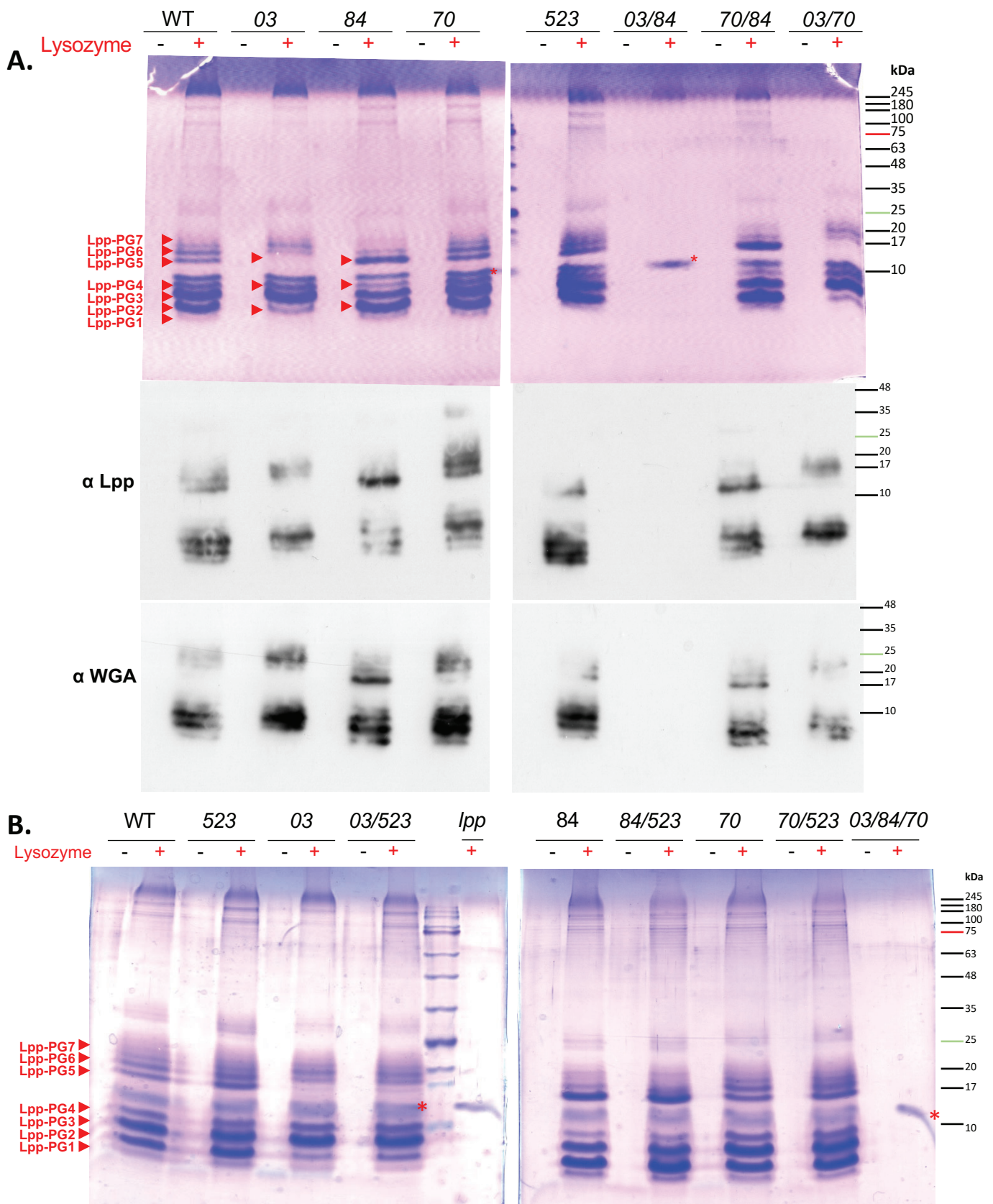


Figure 44. Analyse du couplage de Lpp dans les souches de *D. dadantii* mutées d'un ou de plusieurs gènes *ldt*. **A.** Profils des formes couplées de Lpp des mutants *ldt03* (03), *ldt84* (84), *ldt70* (70) et *ldt523* (523) visualisés en bleu de Coomassie (en haut), par Western blot avec les anticorps anti-Lpp (au milieu) ou avec WGA (en bas). **B.** Profils des formes de Lpp générés par les mutants simples *ldt03*, *ldt84*, *ldt70*, par les mutants doubles (03/523, 70/523 ou 84/523) ou triples (03/84/70) ou par la délétion de *lpp*. L'étoile rouge indique la position du lysozyme. Chaque souche mutante a été cultivée dans BL toute la nuit à 30°C, puis le PG a été extrait, purifié, digéré avec le lysozyme et analysé par SDS-PAGE et/ou Western blot.

plasmide pGEM-T est bien supporté par *D. dadantii* et permet une expression modérée de gènes d'intérêt. Si nécessaire une induction supplémentaire par IPTG, néanmoins plus faible que celle chez *E. coli*, pourrait être réalisée. Cependant, nous avons remarqué un certain effet bactériostatique, voire toxique, lors de l'expression du gène *ldt84* sur le plasmide pGEM-T en présence d'ampicilline à la fois chez le mutant *ldt03/ldt84*, mais également chez la souche sauvage de *D. dadantii* (Fig. 45. A et 45.B). Cet effet était particulièrement visible lors des tests de sensibilité au SDS : lors de l'expression de *ldt84* sur le pGEM-T en absence d'ampicilline, la souche sauvage ou le mutant *ldt03/ldt84* forment des colonies saines (Fig. 45. A, panel gauche). En revanche, lors de l'ajout d'ampicilline dans le milieu (pour maintenir une pression de sélection du plasmide), les souches exprimant *ldt84* forment des colonies translucides affectées dans leur croissance (Fig. 45. A, panel droit et 45.B). Or, comme vu précédemment, ce phénomène n'est pas observable chez *D. dadantii* portant une simple mutation *ldt03* (Fig. 43), ou lors de l'expression de *ldt84* sur plasmide pGEM-T en absence d'ampicilline (Fig. 45. A, panel gauche). Pour ces raisons, et afin d'éviter des biais d'interprétation, tous les gènes *ldt* ont été sous-clonés sur un plasmide pBluescript possédant la résistance à la kanamycine. Ce sont ces constructions qui ont été utilisées pour les expériences du chapitre précédent (Fig. 46) et des chapitres suivants.

3) [Expression hétérologue des Ldt d'*E. coli* chez le mutant *ldt03/ldt84* de *D. dadantii*](#)

Par la suite, nous avons souhaité examiner la capacité des L,D-transpeptidases d'*E. coli* de coupler Lpp au PG chez *D. dadantii*, et comparer les profils de Lpp générés par les Ldts d'*E. coli* à ceux générés par *ldt03* et *ldt84* de *D. dadantii*. Pour rappel, *E. coli* possède six enzymes de la famille YkuD dont cinq L,D-transpeptidases (LdtA à LdtE) et une L,D-endopeptidase LdtF (YafK ou DpaA), tandis que *D. dadantii* ne possède que trois L,D-transpeptidases (Ldt03, Ldt84 et Ldt70) et une L,D-endopeptidase putative, Ldt523. Ldt70 partage la même organisation en domaines et 52 % d'identité de séquence avec LdtD (YcbB), qui effectue le couplage 3→3 de peptides-tiges chez *E. coli* (Magnet *et al.* 2008). Les résultats présentés ci-dessus suggèrent que l'absence de Ldt70 n'affecte pas le couplage de Lpp au PG. Ainsi, Ldt70 serait un orthologue fonctionnel de LdtD et ne serait pas impliquée dans le couplage de Lpp au PG. Les quatre autres L,D-transpeptidases d'*E. coli* (LdtA à LdtE) sont les homologues les plus proches de *ldt03* et *ldt84* qui sont responsables du couplage de Lpp au PG chez *D. dadantii* (Fig. Annexe 2). Comme il a été indiqué ci-dessus (§II. et Fig. 39.A), les séquences C-terminales de Lpp de *D. dadantii* et *E. coli* diffèrent assez significativement, ce qui *a priori* laisse présager une certaine spécificité de L,D-transpeptidases envers la Lpp issue de la même bactérie.

Ainsi, nous avons entrepris d'évaluer la capacité des Ldts d'*E. coli* à lier de façon covalente Lpp de *D. dadantii* au PG. Dans ce but, nous avons cloné les gènes *ldtA*, *ldtB*, *ldtC* et *ldtE* d'*E. coli* et réalisé leur expression ectopique chez le mutant *ldt03/ldt84* de *D. dadantii* chez lequel Lpp n'est plus couplée par les Ldts natives de la bactérie (Fig. 46). Il nous a paru particulièrement intéressant de tester la capacité de LdtE (YnhG) à coupler Lpp. En effet, bien que LdtE (YnhG) ait été démontrée comme étant une Ldt de ménage réalisant les couplages 3→3 chez *E. coli* (Magnet *et al.* 2008), le gène *ldtE* est située à proximité du gène *lpp* (comme *ldt84* chez *D. dadantii*). L'analyse des profils de couplage de Lpp au PG effectués par chacune de quatre Ldt d'*E. coli* montre que LdtA et LdtB génèrent un couplage de Lpp à

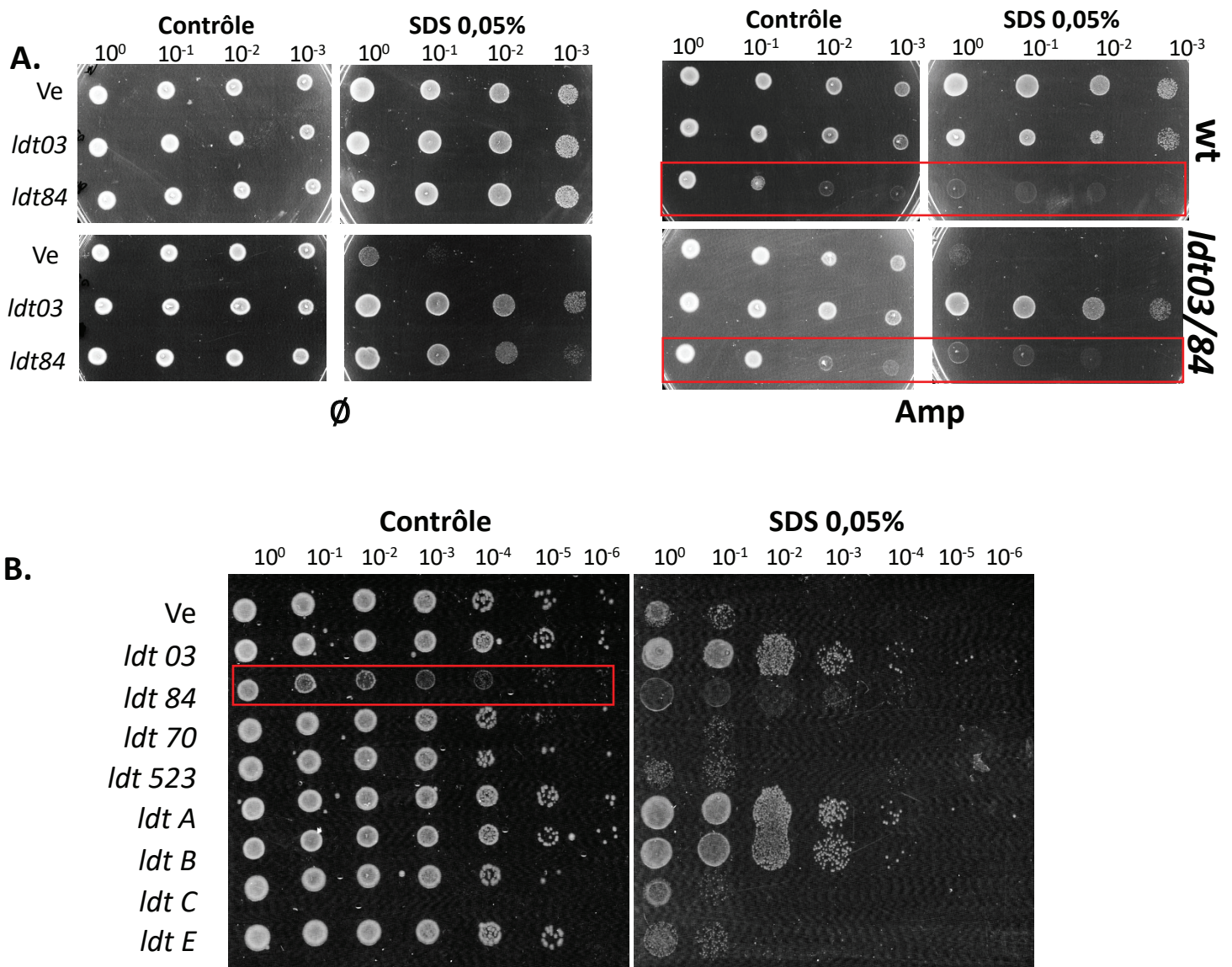


Figure 45. L'expression de *ldt84* sur plasmide pGEM-T provoque un défaut de croissance de *D. dadantii* en présence d'ampicilline. A. Les souches de *D. dadantii* sauvage (en haut) et *ldt03/ldt84* (en bas) complémentées avec les *ldt03*, *ldt84* exprimées sur pGEM-T ont été cultivées dans BL + Amp toute la nuit à 30°C, puis les cultures ont été diluées (jusqu'à 10⁻³) et déposées en gouttes sur un milieu sans amplicilline, avec ou sans SDS (à gauche), et en présence d'ampicilline, avec ou sans SDS (à droite). Les boîtes ont été incubées pendant 48h à 30°C. L'expression de *ldt84* sur plasmide pGEM-T provoque un défaut de croissance (encadré rouge) chez les souches de *D. dadantii* sauvage et *ldt03/ldt84*, en présence d'ampicilline, mais pas en absence d'ampicilline. **B. Test de résistance au SDS de la souche *ldt03/ldt84* complémentée avec les gènes *ldt* de *D. dadantii* et de *E. coli*.** La souche de *D. dadantii ldt03/ldt84* complémentées avec les gènes *ldt* de *D. dadantii* ou d'*E. coli* exprimés sur pGEM-T ont été cultivées dans BL + Amp toute la nuit à 30°C, puis ont été diluées (jusqu'à 10⁻⁷) et déposées en gouttes sur un milieu sans SDS (à gauche) ou contenant du SDS 0,05% (à droite). L'expression de *ldt84* génère un défaut de croissance en présence d'ampicilline, y compris en absence de SDS (encadré rouge).

un taux similaire à celui des Ldt03 et Ldt84 (Fig. 46.A). En revanche, la quantité de Lpp couplée par LdtC est sensiblement plus faible que celle par LdtA et LdtB, alors qu'aucune forme de Lpp couplée au PG n'est visible dans la souche exprimant LdtE (Fig. 46.A). De plus, l'analyse des profils générés par LdtA, LdtB et LdtC suggère que, comme les Ldts de *D. dadantii*, celles-ci possèdent une spécificité enzymatique. En effet, la digestion du PG par le lysozyme dans la souche exprimant *ldtA* (*erfK*) génère un profil de Lpp enrichi en Lpp-PG2 et appauvri en Lpp-PG5 (Fig. 46.A). Ce profil semble donc particulièrement similaire à celui de la souche exprimant *ldt84*. À l'inverse, le profil de Lpp généré par LdtB paraît similaire à celui de Ldt03. Plus précisément, les bandes protéiques correspondant à Lpp-PG1 et Lpp-PG5 sont plus abondantes (Fig. 46.A). Quant à LdtC, l'intensité du profil de digestion du PG est trop faible pour pouvoir conclure de manière certaine sur sa similarité avec des profils de LdtA ou LdtB (sur la Fig. 46. A, le PG de LdtC a été concentré 4x avant dépôt). Néanmoins, il semblerait que les bandes protéiques correspondant à Lpp-PG1 et Lpp-PG5 soient plus abondantes chez la souche exprimant LdtC (Fig. 46.A). De fait, le profil généré par LdtC se rapprocherait du profil de LdtB et Ldt03 (Fig. 46.A). Ce dernier résultat est inattendu puisque d'après la comparaison de séquences, LdtC partage plus de similarité avec Ldt84, qu'avec Ldt03 ou LdtB (Fig. Annexe 2). De même, LdtA partage plus de similarité avec Ldt03 et LdtB (Fig. Annexe 2). Pourtant LdtA réalise un couplage similaire à Ldt84 (Fig. 46.A).

En parallèle, afin d'estimer la capacité des Ldts d'*E. coli* à compléter les défauts de stabilité de l'enveloppe de la souche *ldt03/ldt84* de *D. dadantii*, nous avons effectué des tests de sensibilité au SDS. Les résultats de ces tests montrent que les LdtA, LdtB d'*E. coli* restaurent la résistance au SDS au même niveau que les Ldt03 et Ldt84 de *D. dadantii* (Fig. 46.B). En revanche, LdtC d'*E. coli* ne complète pas aussi efficacement les défauts de l'enveloppe du double mutant *ldt03/ldt84* de *D. dadantii* que LdtA et LdtB, ce qui est cohérent avec la faible efficacité du couplage de Lpp chez la souche exprimant LdtC (Fig. 46. A et 46.B). Par ailleurs, en accord avec les résultats en SDS-PAGE (Fig. 46.A), LdtE ne restaure pas la résistance au SDS de *D. dadantii* (Fig. 46.B).

Nous avons également souhaité tester l'effet de la présence de phosphate dans le milieu sur l'activité des Ldts d'*E. coli* et de *D. dadantii*. Cette expérience a été menée dans le but d'identifier des conditions particulières d'activité des Ldts. Pour cela, nous avons supplémenté les boîtes de SDS avec du NaH_2PO_4 à concentration finale de 50 mM, tout en maintenant le pH du milieu à 7,2 (Fig. 46.C). De façon surprenante, les résultats de ces tests révèlent que seules la Ldt03 et la LdtA sont capables de restaurer la résistance au SDS chez ces souches en présence de 50mM de NaH_2PO_4 (Fig. 46.C), suggérant que différentes Ldts possèdent effectivement des conditions particulières pour leur activité. Rappelons que les résultats précédents ont montré que Ldt03 et LdtA génèrent des profils différents de Lpp couplée aux résidus de PG (Fig. 46. A et Annexe 2). Cependant, nous ne saurions pas expliquer la pertinence biologique de l'augmentation de la concentration de phosphate et son impact sur l'activité des L,D-transpeptidases, ni les conditions *in vivo* dans lesquelles peuvent se dérouler ce processus.

L'ensemble de ces résultats suggère donc que LdtE n'est pas capable de coupler Lpp au PG, malgré sa similarité apparente avec LdtA et LdtB et bien que le gène *ldtE* soit à côté du gène *lpp* comme *ldt84* chez *D. dadantii*. Par ailleurs, LdtA et LdtB d'*E. coli* sont capables de lier Lpp de *D. dadantii* au PG en

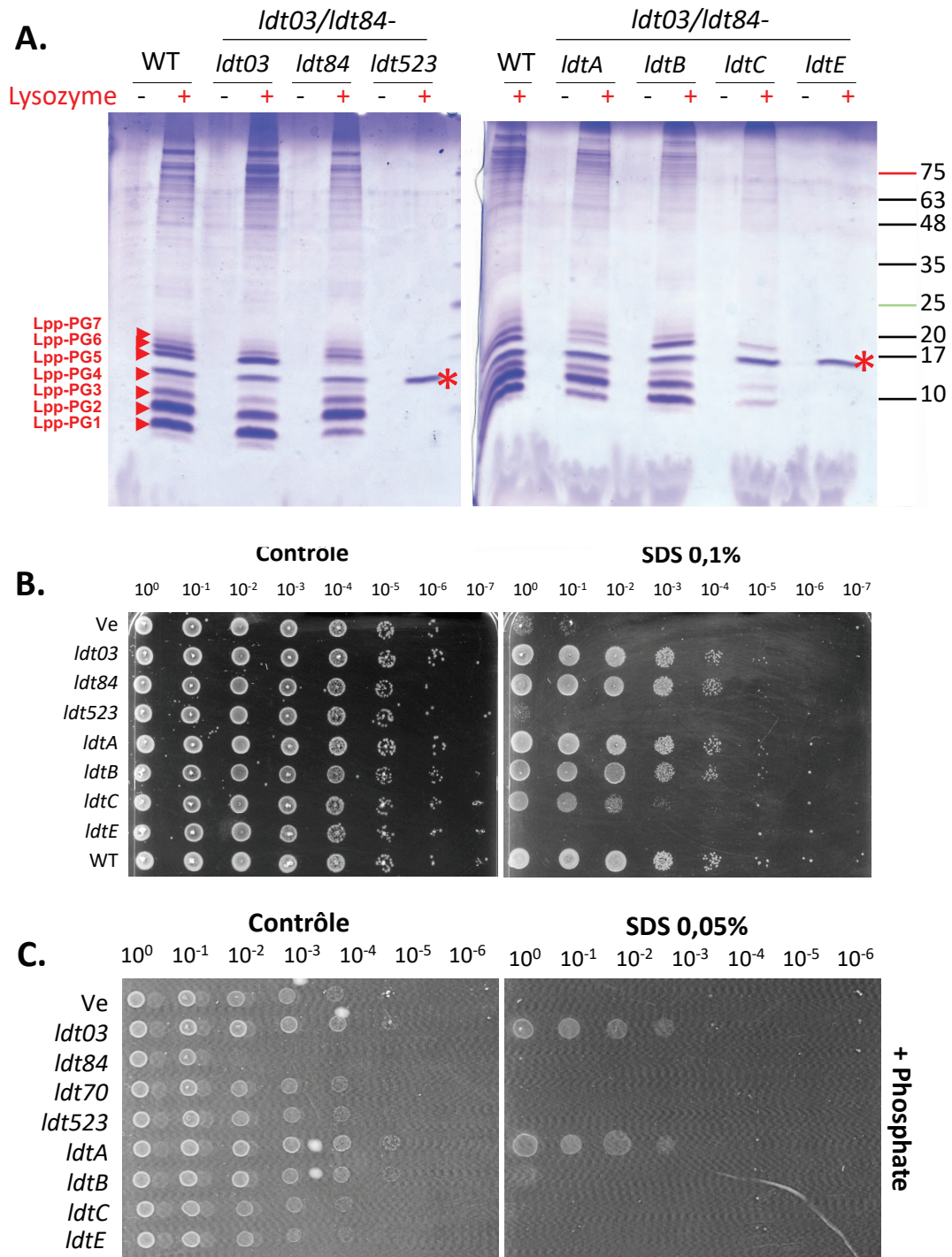


Figure 46. A. Analyse du couplage de Lpp par les Ldt de *D. dadantii* et d'*E. coli*. Le mutant *ldt03/ldt84* de *D. dadantii* a été complété avec les gènes *ldt03*, *ldt84* et *ldt523* de *D. dadantii*, ou alors avec les gènes *ldtA*, *ldtB*, *ldtC* et *ldtE* d'*E. coli*, exprimées sur plasmide pBS KS (Kan^R). Le PG de ces souches a été purifié et a été digéré par le lysozyme. Les protéines libérées ont ensuite été séparées sur gel SDS-PAGE (18 % tris-tricine) et colorées au bleu de Coomassie. Le PG de la souche exprimant *ldtC* a été concentré 4 fois. **B. Test de sensibilité au SDS du mutant *ldt03/ldt84* de *D. dadantii* complété avec les gènes *ldt* de *D. dadantii* et *E. coli*.** Les souches de *D. dadantii* *ldt03/ldt84* complétées avec les *ldt* de *D. dadantii* ou d'*E. coli* a été cultivée dans BL + Kan toute la nuit à 30°C, puis les cultures ont été diluées (jusqu'à 10⁻⁷) et déposées en gouttes sur un milieu sans SDS (à gauche), ou avec du SDS à une concentration de 0,1% (à droite). Les boîtes ont été incubées pendant 48h à 30°C. **C.** Le même test de résistance au SDS que présenté en **B.** a été réalisé en dans un milieu contenant 50 mM de NaH₂PO₄ 50 mM.

faisant cela aussi efficacement que les deux Ldt natives, Ldt03 et Ldt84. Or, comme cela a été évoqué auparavant, et vu la différence apparente des régions C-terminales de Lpp d'*E. coli* et *D. dadantii* (Fig. 39.A), on a pu penser *a priori* que les Ldt d'*E. coli* seraient moins efficaces chez *D. dadantii*. De plus, tout comme les Ldt03 et Ldt84, les LdtA et LdtB d'*E. coli* semblent posséder une spécificité enzymatique vis-à-vis du site de couplage. En effet, à notre connaissance, une quelconque spécificité enzymatique d'une Ldt de type « Lpp-active » vis-à-vis de la zone de couplage n'a jamais encore été observée. Ce phénomène (analysé plus en détails plus bas, chapitre 'Spécificité enzymatique des Ldt03 et Ldt84', Fig. 48) peut apporter une explication de la redondance apparente de Ldts chez les protéobactéries.

4) [Test de stabilité de l'enveloppe](#)

Dans une approche complémentaire aux tests de sensibilité au SDS décrits plus haut (Fig. 43 et 46.B), nous avons souhaité évaluer l'effet de la déstabilisation de l'enveloppe provoquée par l'absence de Lpp ou de certaines Ldt sur la sécrétion de pectinases (Fig. 47). *D. dadantii* sécrète des pectinases par le T2SS, un complexe multiprotéique qui traverse l'enveloppe bactérienne (voir chapitre 'T2SS', bibliographie). Ainsi, lorsque l'enveloppe est déstabilisée par défaut de couplage du Lpp au PG, il est possible que la mise en place du T2SS à travers l'enveloppe soit affectée, et que par conséquent, le taux de sécrétion de pectinases soit diminué. Pour ces tests nous avons utilisé des souches mutantes de *D. dadantii* dépourvues de *lpp* ou de certains gènes *ldt* (Fig. 47.A) et le double mutant $\Delta ldt03/ldt84$ complémenté avec les *ldt* de *D. dadantii* ou d'*E. coli* (Fig. 47.B). Afin d'évaluer le taux de sécrétion de pectinases, nous avons utilisé un milieu gélosé contenant du polygalacturonate de sodium, un dérivé de la pectine. Suite à la sécrétion de pectinases par les bactéries, le polygalacturonate est dégradé, ce qui provoque l'apparition d'un halo autour des bactéries. Ce test est semi-quantitatif, puisque la taille du halo est corrélée à l'efficacité de digestion de la pectine, et donc de la quantité de pectinases produites et sécrétées. Les tests de sécrétion de pectinases montrent que les mutants *lpp*, *ldt03/ldt84*, ainsi que *ldt03/ldt84/ldt70* étaient entourés de halos de dégradation significativement plus petits que ceux entourant la souche sauvage (Fig. 47.A). Ce résultat indique que ces souches sécrètent moins efficacement des pectinases. En revanche, les mutations *ldt03*, *ldt84*, *ldt70* et *ldt523* ne semblent pas affectés pour la sécrétion de pectinases (Fig. 47.A). De même pour les mutants *ldt70/ldt84*, *ldt84/ldt70*, *ldt03/523* et *ldt84/ldt523* (Fig. 47.A). Curieusement, la délétion de *ldt03/ldt70* et *ldt70/ldt523* semble affecter légèrement la sécrétion de pectinases (Fig. 47.A). Cependant, une analyse plus précise de ces résultats permet de détecter des différences plus nuancées entre ces souches. Par exemple, il semble que la délétion de *lpp* provoque un effet un peu plus fort sur la sécrétion que la double délétion *ldt03/ldt84*. De même, les mutants simples *ldt03*, et en particulier *ldt84*, semblent générer des halos légèrement moins grands que la souche sauvage (Fig. 47.A). Toutefois, ces résultats nécessitent la réalisation de multiples répliques biologiques pour bien quantifier de telles différences.

Dans une approche inverse, nous avons complémenté le double mutant *ldt03/ldt84* avec les *ldt* de *D. dadantii* et d'*E. coli* pour déterminer leur efficacité à restaurer la sécrétion de pectinases (Fig. 47.B). Les résultats montrent que le double mutant *ldt03/ldt84* complémenté avec *ldt70*, *ldt523* ou *ldtE* présentait des halos de même taille qu'avec le contrôle négatif, le vecteur vide (Fig. 47.B). Les bactéries exprimant *ldtC* forment des halos légèrement supérieurs au contrôle négatif. En revanche, la

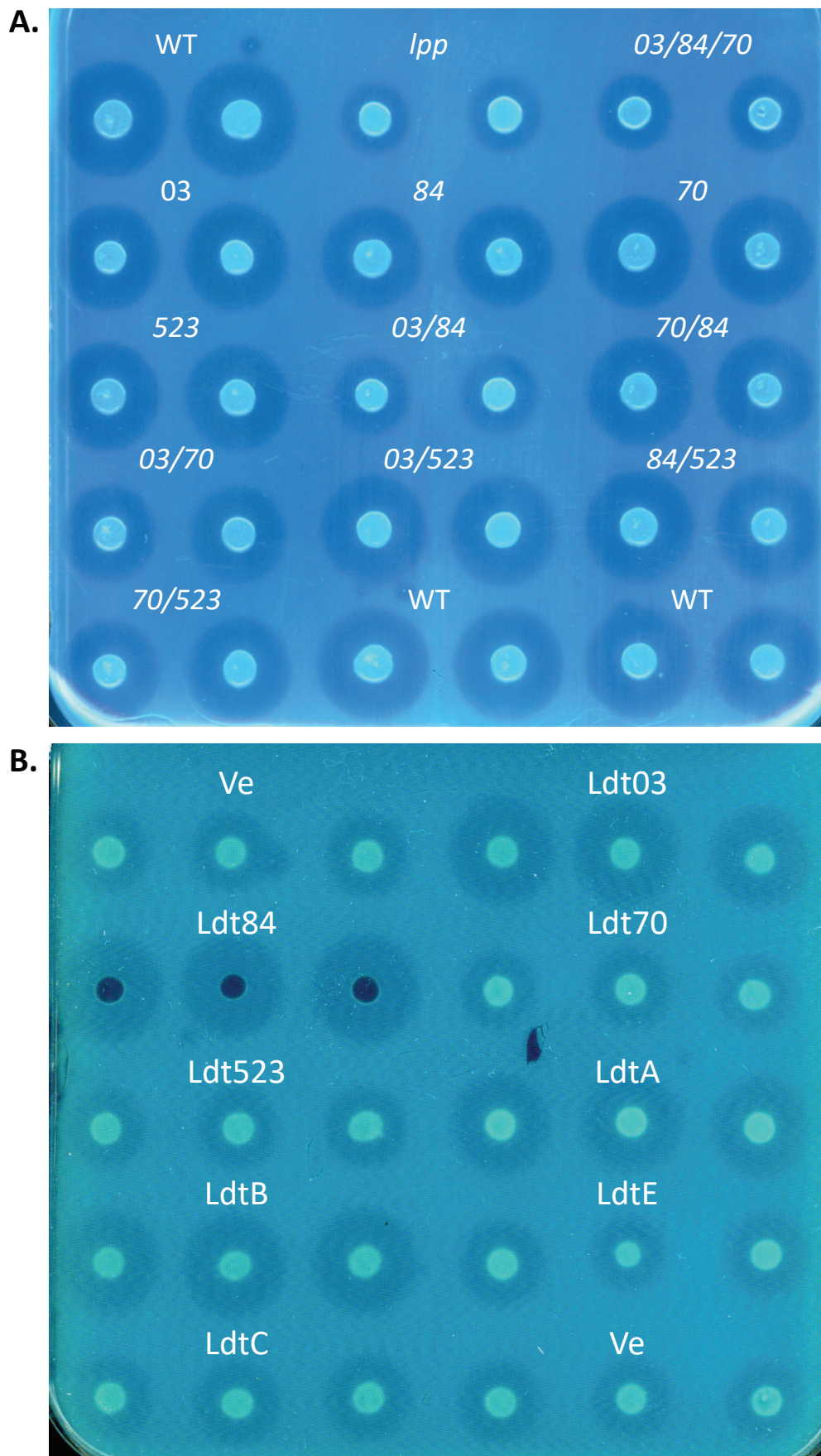


Figure 47. A. Test de sécrétion de pectinases des souches de *D. dadantii* mutées d'un ou de plusieurs gènes *ldt* ou du gène *lpp*. Les souches de *D. dadantii* mutées pour un ou plusieurs gènes *ldt* ou pour le gène *lpp* ont été cultivées dans BL toute la nuit à 30°C, puis les cultures ont été diluées à DO=1 et déposées en gouttes sur un milieu contenant du polygalacturonate de sodium (dérivé de la pectine). La taille du halo autour des colonies est proportionnelle à la production et/ou la sécrétion de pectinases dans le milieu.. **B. Test de sécrétion de pectinases du mutant *ldt03/ldt84* complémenté avec les gènes *ldt* de *D. dadantii* et d'*E. coli*.** Les souches de *D. dadantii* *ldt03/ldt84* complémentées avec les gènes *ldt* de *D. dadantii* ou d'*E. coli* exprimés sur pGEM-T ont été cultivées dans BL + Ap toute la nuit à 30°C, puis ont été diluées à DO=1 et déposées en gouttes sur un milieu contenant du polygalacturonate.

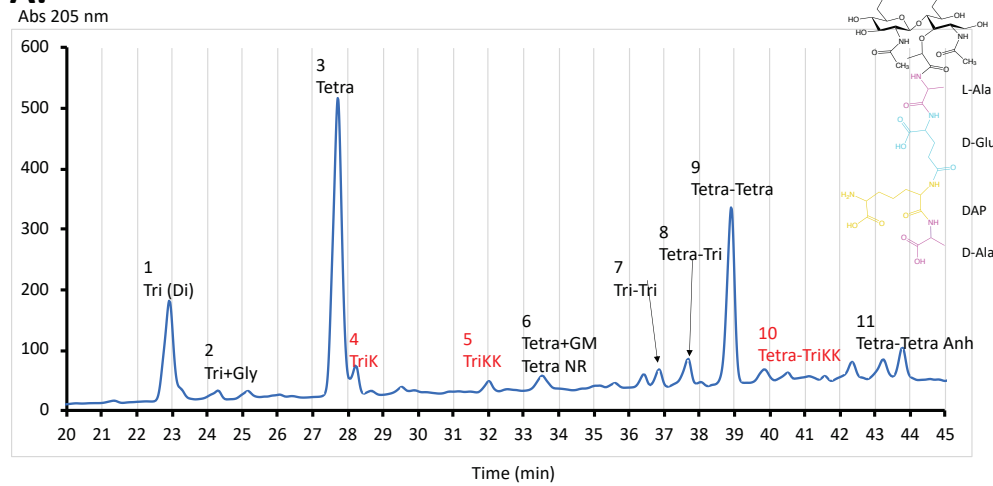
souche mutante complémentée avec *ldt03*, *ldt84*, *ldtA* ou *ldtB* forme de grands halos de taille comparable, même si ceux avec *ldtA* semblent être légèrement plus petits. (Fig. 47.B). Ces derniers résultats témoignent de la restauration de la sécrétion par le T2SS. De plus, ces résultats sont en adéquation avec les tests de sensibilité au SDS et l'analyse de couplage de Lpp au PG (Fig. 43 et 46). Ensemble, ces résultats montrent que les LdtA et LdtB d'*E. coli* possèdent une activité croisée envers Lpp de *D. dadantii*, bien que la région C-terminale de Lpp de ces deux bactéries soit assez dissimilaire.

Il n'est pas exclu que l'action de ces Ldts permette également un meilleur couplage d'OutB au PG (voir résultats plus bas, Fig. 49), et par conséquent une mise en place plus efficace du T2SS à travers l'enveloppe. Par ailleurs, il semble nécessaire de garder du recul par rapport aux résultats de sécrétion de pectinases, puisque la taille des halos dépend de la sécrétion, mais également de la production de pectinases. Cette dernière n'a pas été testée dans ces expériences. Il n'est donc pas exclu que la déstabilisation de l'enveloppe puisse également déclencher l'activation d'un ou de plusieurs systèmes de stress extra cytoplasmique tel que Cpx, qui vont à leur tour diminuer l'expression de gènes *pel*. Ainsi, une analyse plus fine et poussée de la production et de la sécrétion des pectinases serait nécessaire. Cela peut se faire en réalisant des cultures en milieu liquide contenant un dérivé pectique comme l'inducteur de gènes *pel* et *out*, et en quantifiant ensuite par Western blot la présence de pectinases dans les extraits cellulaires (production) et dans le surnageant (sécrétion).

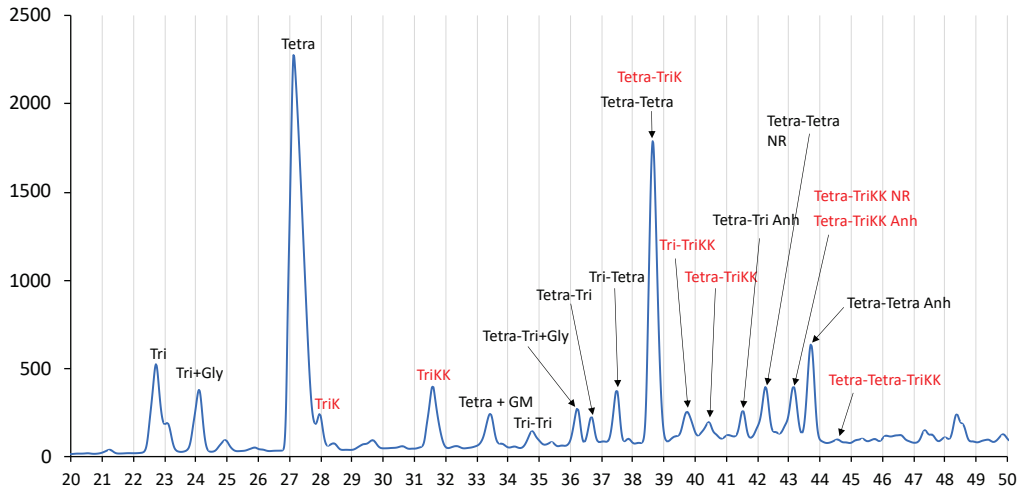
5) Spécificité enzymatique des Ldt03 et Ldt84

Les profils de formes Lpp-PG générés par les Ldt03 et Ldt84 visibles en SDS-PAGE et en Western blot (Fig. 44. A et 46.A) suggèrent que chacune de ces enzymes possède une spécificité enzymatique envers des régions du PG. Afin de déchiffrer la nature exacte d'une telle spécificité, nous avons établi une collaboration avec l'équipe du Dr. Michel Arthur (CRC UMR S 1138, Inserm, Paris) qui est en outre spécialisée dans l'étude des L,D-transpeptidases d'*E. coli*. Cette collaboration nous a permis d'une part, de déterminer la composition du PG de *D. dadantii*, et d'autre part de déchiffrer la spécificité enzymatique des Ldt03 et Ldt84 de *D. dadantii*. Pour réaliser ce projet, nous avons fourni le peptidoglycane purifié à partir de culture de la souche sauvage de *D. dadantii*. Par la suite, le PG a été digéré par le lysozyme, puis par la trypsine. Les échantillons ont été analysés par nos collaborateurs à Paris, et les données ont été collectées et analysées par Yucheng LIANG, étudiante en thèse au CRC (Paris). L'analyse par HPLC-MS/MS du PG de la souche sauvage de *D. dadantii* a révélé que celui-ci possédait la même composition que celui d'*E. coli* (Fig. 48.A). A savoir que le peptide-tige est composé de L-Ala¹, D-iGlu², mDAP³, D-Ala⁴, D-Ala⁵ (Fig. 3). Les mucopeptides élués lors de l'analyse par HPLC-MS/MS révèlent la présence de plusieurs types de mucopeptides. On peut notamment visualiser les peptides monomériques reliés au disaccharide GlcNac-MurNac, comme les tripeptides monomériques (Tri) au pic d'éluion (PEI) n°1, de térapeptides terminés par une glycine (Tri+Gly) (PEI n°2), de térapeptides monomériques (Tetra) (PEI n°3) (Fig. 48.A). De plus, le PG de *D. dadantii* est composé de mucopeptides dimériques, c'est-à-dire deux peptides-tiges reliés entre eux par une liaison covalente, comme les tripeptides dimériques (Tri-Tri) reliés par une liaison (3→3) (PEI n°7), les térapeptides reliés à un tripeptide par une liaison (4→3 ou 3→3) (Tetra-Tri) (PEI n°8), les térapeptides dimériques reliés par une liaison (4→3) (Tetra-Tetra) (PEI n°9), et les térapeptides dimériques dont l'un des peptides

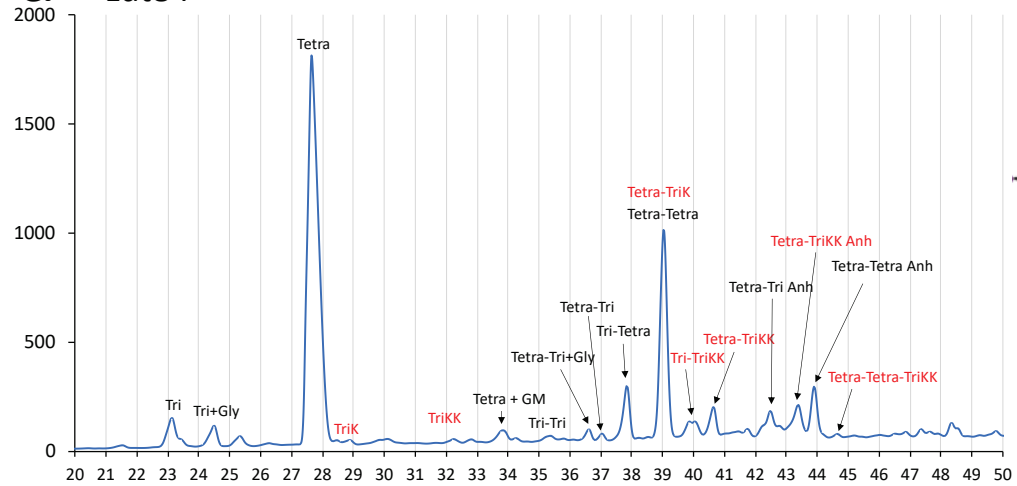
A. WT



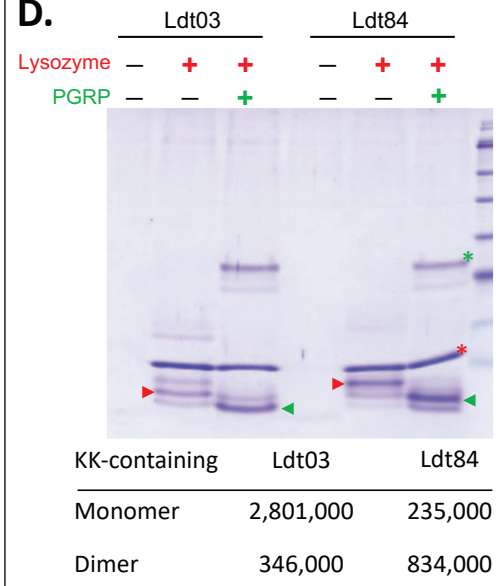
B. Ldt03



C. Ldt84



D.



E.

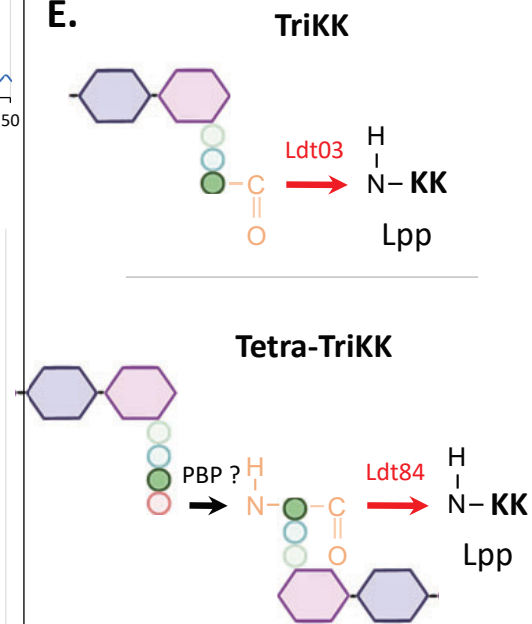


Figure 48. Profils de HPLC-MS/MS de l'analyse du PG de *D. dadantii* sauvage (A), du mutant *ldt84* (exprimant Ldt03) (B) et du mutant *ldt03* (exprimant Ldt84) (C). Les bactéries ont été cultivées jusqu'à DO=1,5. Le PG a été extrait, puis digéré sur la nuit au lysozyme, puis 6h par la trypsine puis analysé par HPLC-MS/MS au laboratoire de Michel ARTHUR. Muropeptides monomériques : tripeptide (Tri) et tétrapeptide (Tetra). Muropeptides dimériques : Tri-Tri ou Tetra-Tri. Tri-K(K) : tripeptide lié à Lpp, Tetra-K(K) : tétrapeptide lié à Lpp. Tetra-Tri-K(K) : tétrapeptide relié à un tripeptide (4→3 ou 3→3) lié à Lpp, Tri-Tri-K(K) : tripeptide lié à un tripeptide (3→3) lié à Lpp. GM : GlcNAc-MurNAc, NR : non-réduit. **D. Analyse de l'abondance des formes de Lpp liées au PG chez le mutant *ldt03* ou *ldt84*.** Le PG des souches de *D. dadantii* mutée de gènes *ldt03* et *ldt84* a été digéré avec le lysozyme ou l'amidase et analysé par SDS-PAGE. On peut constater que les formes de Lpp couplées au PG avec Ldt84 ont un poids apparent plus élevé qu'avec Ldt03. En bas est représenté une quantification de formes de Lpp couplées au muropeptides monomériques et dimériques selon les analyses présentées en panels B et C. Chez le mutant *ldt84*, exprimant Ldt03 (à gauche) les formes de Lpp couplées à un monomère de muropeptide (2,801,000) sont plus abondantes que les formes de Lpp couplées à un dimère de muropeptides (346,000). Chez le mutant *ldt03*, exprimant Ldt84 (à droite), les formes de Lpp couplées à un monomère de muropeptide (235,000) sont moins abondantes que les formes de Lpp couplées à un dimère de muropeptides (834,000). **E. Schéma représentant la possible spécificité enzymatique de Ldt03 (en haut) et de Ldt84 (en bas).** Les analyses de PG par HPLC-MS/MS ont été réalisées au laboratoire de Michel ARTHUR par Mme Yucheng LIANG.

est relié à un anhydroMurNac (Tetra-Tetra Anh) (PEI n°11) (Fig. 48.A). Ces résultats témoignent de l'activité de PBPs et de Ldts dans la synthèse du PG de *D. dadantii*. De plus, les peptides retrouvés dans les PEI n°4, 5 et 10 sont respectivement des tripeptides monomériques (TriK et TriKK) ou des peptides dimériques (Tetra-TriKK) reliés aux lysines C-terminales de Lpp (Fig. 48.A).

L'analyse par HPLC-MS/MS des muuropeptides du PG des deux souches de *D. dadantii* portant une mutation *ldt03* ou *ldt84* a démontré qu'effectivement les Ldt03 et Ldt84 possédaient chacune une spécificité enzymatique, puisque leurs profils de HPLC sont différents (Fig. 48.B et 48.C). Plus précisément, l'analyse de la composition des muuropeptides du mutant *ldt84* (qui exprime uniquement Ldt03), montre que les peptides couplés au motif C-terminal de Lpp (KK) sont majoritairement des peptides monomériques (Fig. 48.C et 48.D). En revanche, dans la souche mutante *ldt03* (exprimant uniquement Ldt84), l'abondance des dimères rattachés à des lysines est supérieure, ce qui suggère que Lpp est majoritairement rattachée à des peptides dimériques (Fig. 48.C et 48.D). Ces résultats sont en accord avec notre analyse sur gel SDS-PAGE du PG issu des mutants *ldt03* et *ldt84* (Fig. 48.D). Effectivement, la digestion du PG de la souche sauvage de *D. dadantii* par l'amidase PGRP, génère deux formes de Lpp de petit poids moléculaire (Lpp-PT1 et Lpp-PT2), en quantités similaires. Dans le PG du mutant *ldt84*, qui ne produit que Ldt03, la forme la plus petite Lpp-PT1 est plus abondante, ce qui pourrait correspondre à Lpp attachée à un peptide-tige monomérique (Fig. 48.E). En revanche, chez le mutant *ldt03*, c'est la forme de Lpp de plus haut poids moléculaire (Lpp-PT2) qui est majoritaire, et pourrait correspondre à Lpp attachée à un peptide-tige dimérique (Fig. 48.D et 48.E). Par ailleurs, les profils de Lpp générés lors de l'expression de Ldt03 et Ldt84 dans le double mutant *ldt03/ldt84* de *D. dadantii* ont été respectivement similaires aux profils de Lpp générés par LdtA et LdtB d'*E. coli* (Fig. 46.A). Il est donc possible que ces L,D-transpeptidases d'*E. coli* possèdent elles aussi la même spécificité enzymatique envers les peptides-tiges que Ldt03 et Ldt84. La spécificité enzymatique de LdtC n'a pas pu être déterminée avec certitude car le profil de digestion de LdtC est trop faible dans les conditions testées (Fig. 46.A). Néanmoins, ces résultats de HPLC-MS/MS pourraient être reliés avec la faible intensité de profil de LdtC. En effet, il apparaît que les tripeptides dimériques (3→3) reliés à Lpp sont minoritaires par rapport aux dimères térapeptide-tripeptides (4→3) reliés à Lpp (Fig. 48.B et 48.C). Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que les substrats de LdtC sont des tripeptides dimériques (3→3), minoritaires dans la cellule (Fig. 48.A). Cela expliquerait alors la faible intensité des profils générés par LdtC (Fig. 46.A). Cette hypothèse pourrait être testée en effectuant l'expression ectopique de LdtC dans le triple mutant *ldt03/ldt84/ldt70* chez lequel le couplage de tripeptides (3→3) est théoriquement aboli. Cependant, on ne peut non plus exclure que LdtC présente une activité spécifique plus faible envers Lpp de *D. dadantii* ou que le substrat de LdtC soit une autre protéine d'*E. coli* (à découvrir). Par ailleurs, l'activité enzymatique plus forte de Ldt84 envers les peptides-tiges dimériques pourrait expliquer la toxicité de son expression en présence d'ampicilline (Fig. 45). En effet, les peptides dimériques Tétra-Tri sont les plus abondants, et leur formation nécessite l'action de PBPs, inhibées pas les β-lactames comme l'ampicilline. De fait l'inhibition des PBPs par l'ampicilline surtout dans les premières heures de cultures diluées déposées en gouttes lors des tests de résistance au SDS (malgré l'expression de la β-lactamase BlaM par le pGEM-T) empêcherait la formation du substrat de Ldt84 et donc le couplage covalent de Lpp au PG. Néanmoins, cela n'explique pas les raisons de

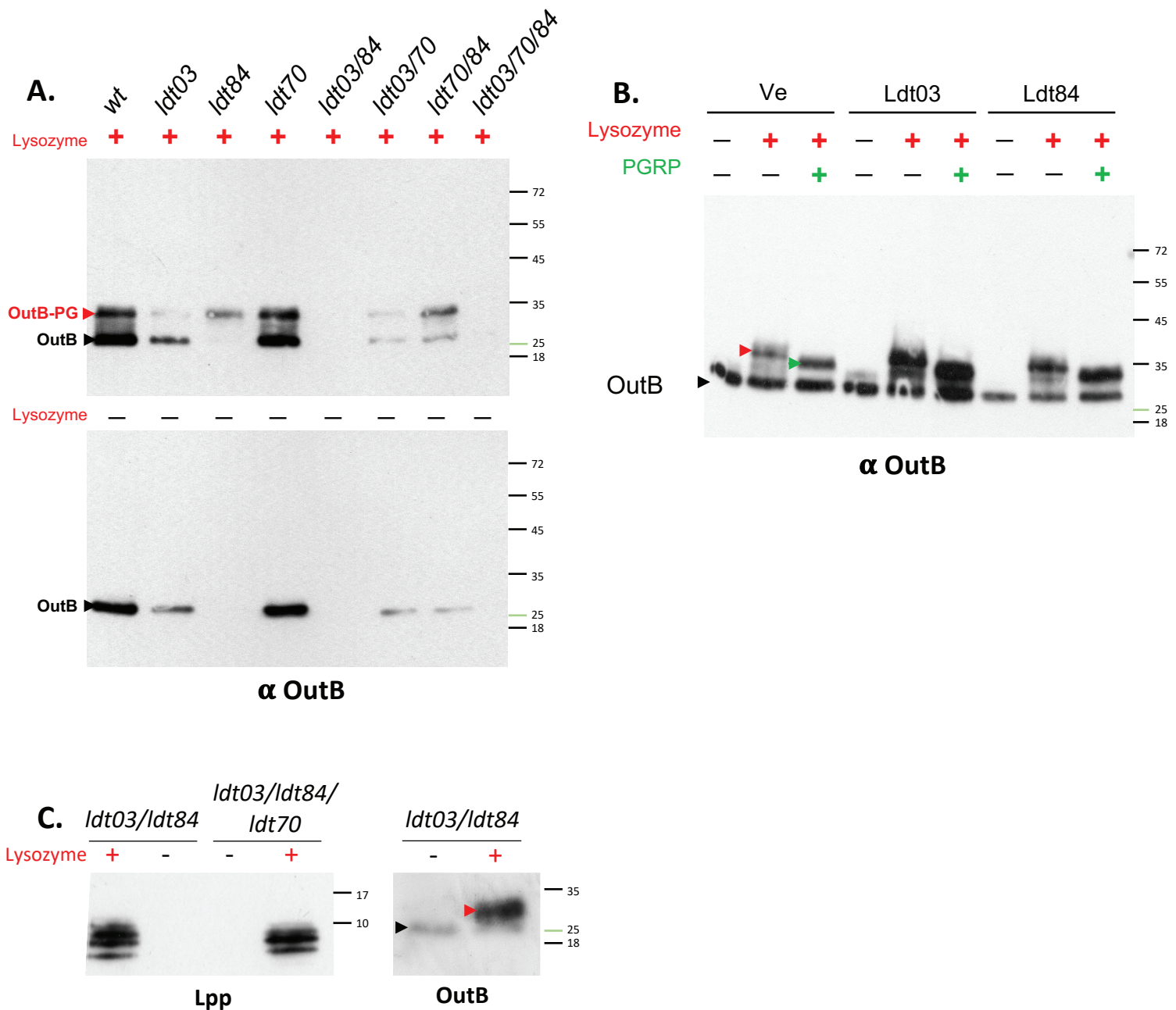


Figure 49. Analyse du couplage d'OutB au PG chez les mutants de *D. dadantii* dépourvus d'un ou de plusieurs gènes *ldt*. Le PG des souches mutées de gènes *ldt* et exprimant *outB* sur plasmide pGEM-T a été purifié, puis digéré au lysozyme (panel en haut) ou non (panel en bas). Les protéines libérées ont été séparées sur gel SDS-PAGE (10 % tris-glycine) puis révélées par western blot avec les anticorps anti-OutB. **B. Expression ectopique de *ldt03* et *ldt84* chez la souche sauvage de *D. dadantii*.** Le PG de la souche sauvage exprimant *ldt03* ou *ldt84*, ou portant un vecteur vide (Ve) a été purifié, digéré par le lysozyme ou PGRP et analysé par Western blot avec les anticorps anti-OutB. **C. Une faible quantité de Lpp et d'OutB est couplée au PG même en absence de *Ldt03* et *Ldt84*.** Le PG purifié des souches de *D. dadantii* double *ldt03/ldt84* ou triple *ldt03/ldt84/ldt70* mutants a été digéré avec le lysozyme et analyse par Western avec anti-OutB. L'exposition prolongée du western blot (45 min contre 3 min en Panel A) permet de distinguer des formes de Lpp et d'OutB couplées au PG même en absence de *Ldt03* et de *Ldt84*.

l'absence d'un tel phénomène avec LdtA qui semble elle-aussi réaliser le couplage de Lpp à des peptides dimériques, ou de LdtC qui possède le plus haut taux d'identité avec Ldt84.

6) Identification des Ldts de *D. dadantii* responsables du couplage d'OutB au PG

Afin d'identifier les Ldts impliquées dans le couplage d'OutB au PG de *D. dadantii*, le PG des souches mutées de *ldt* et exprimant outB sur plasmide ont été analysés par Western blot avec les anticorps dirigés contre OutB (Fig. 49.A). Comme observé avec Lpp, la suppression de *ldt70* n'a pas altéré le profil d'OutB, suggérant que Ldt70 n'est pas impliquée dans le couplage d'OutB au PG (Fig. 49.A). En revanche, les mutations *ldt03* et *ldt84* ont provoqué une diminution notable de la quantité d'OutB couplée au PG, OutB-PG, ainsi qu'OutB « piégée », mais avec des ratios différents pour chaque mutant (Fig. 49.A). Aucune trace d'OutB n'a été détectée dans le double mutant *ldt03/ldt84* (Fig. 49.A) et une faible proportion d'OutB a été détectée dans le PG du mutant *lpp* (non montré), ce qui suggère que d'une part Ldt03 et Ldt84 sont responsables du couplage d'OutB au PG, mais également que le couplage d'OutB serait dépendant, directement ou indirectement, de la présence de Lpp. Ce dernier résultat pourrait être lié à une déstabilisation importante de l'enveloppe et de la couche de PG dans le mutant *lpp* ce qui pourrait empêcher le couplage d'OutB au PG. Dans une approche complémentaire, l'expression ectopique des gènes *ldt03* et *ldt84* dans la souche sauvage a généré la formation plus importante de formes OutB couplées aux résidus de PG (Fig. 49.B). En particulier, l'expression de *ldt03* a généré des formes d'OutB-PG plus abondantes que l'expression de *ldt84* (Fig. 49.B). Ce résultat suggère que Ldt03 serait plus active que Ldt84 dans le couplage d'OutB au PG. La digestion du PG par PGRP génère une bande de poids moléculaire inférieur à celle libérée par l'action du lysozyme qui peut correspondre à OutB couplée au peptide-tige (Fig. 49.B). Comme OutB a un poids moléculaire beaucoup plus élevé que Lpp, il est impossible de distinguer par Western la nature du peptide-tige attaché à OutB, monomère ou dimère. Curieusement, comme cela était observé avec Lpp, une quantité minime d'OutB liée au PG est visualisée dans le double mutant *ldt03/ldt84* ou dans le mutant *ldt03/ldt84/ldt70*, lors d'une exposition prolongée en Western blot (Fig. 49.C). Pourtant, aucune des Ldt *a priori* active sur OutB ou Lpp n'est présente chez ces souches. Cette observation suggère l'existence d'une autre enzyme non encore identifiée, capable de réaliser un attachement de Lpp et OutB au PG.

Ensemble, ces résultats montrent que comme pour Lpp, le couplage d'OutB est réalisé par les Ldt03 et Ldt84. Ldt03 semble avoir une action prépondérante pour le couplage d'OutB au PG. Toutefois, à la différence de Lpp, la résolution des Western blot ne nous permet pas d'apprécier de manière plus précise la spécificité enzymatique de Ldt03 et Ldt84 vis-à-vis d'OutB. La protéine OutB purifiée exprimée chez les mutants *ldt03* ou *ldt84* permettra de confirmer une spécificité enzymatique de Ldt03 et Ldt84 vis-à-vis d'OutB.

WT

lpp

03

84

03/84

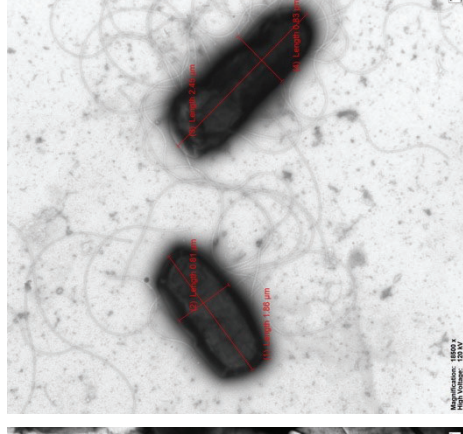
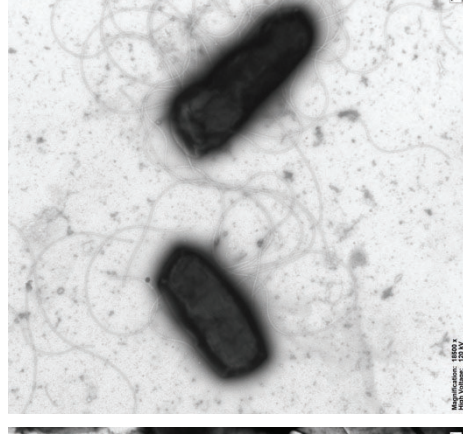
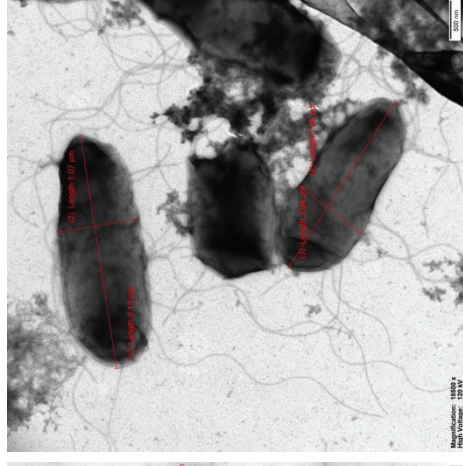
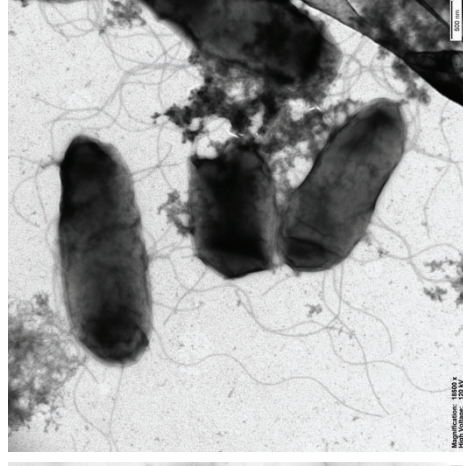
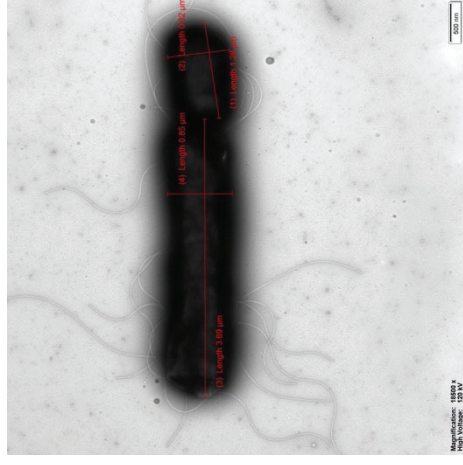
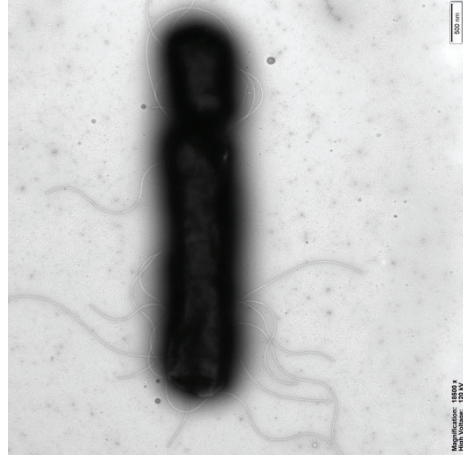
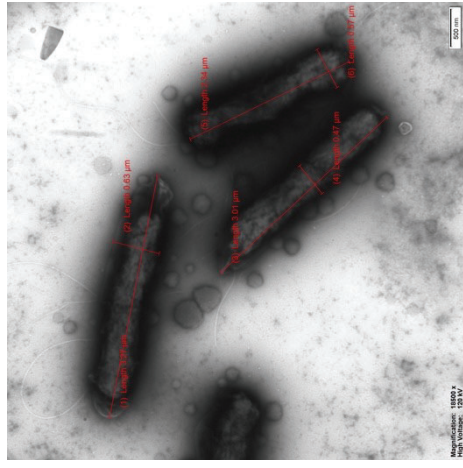
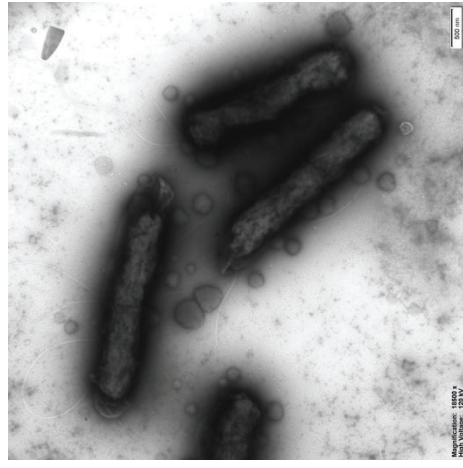
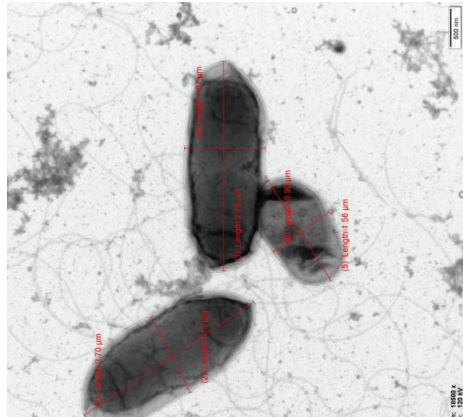
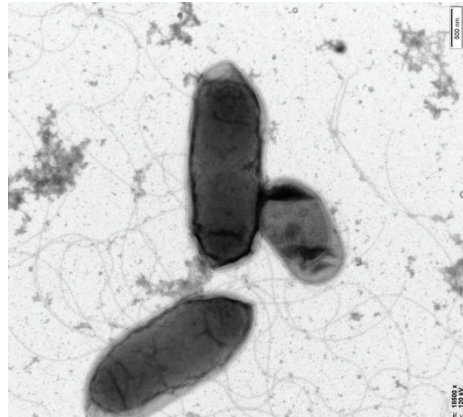


Figure 50. Observation en microscopie électronique des souches de *D. dadantii* mutées d'un ou de plusieurs gènes *lbt* et de *lpp* en coloration négative. La barre d'échelle indique 500 nm.

V) Visualisation de l'enveloppe des mutants *lpp* et *ldt* de *D. dadantii* par microscopie électronique

L'absence de *lpp*, ou l'absence de son couplage au PG, sont connus pour provoquer la déstabilisation des parois et des multiples défauts, qui sont visibles en microscopie électronique (voir chapitre 'Lpp', partie bibliographique) (Asmar *et al.* 2017; Mathelié-Guinlet *et al.* 2020). Nous avons donc entrepris de visualiser l'impact des mutations *lpp* et *ldt* sur l'intégrité de l'enveloppe de *D. dadantii*. Dans ce but, nous avons établi une collaboration avec l'équipe de Pr. Robert CZAJKOWSKI (Université de Gdańsk, Pologne) qui travaille sur une bactérie proche, *D. solani* et a un accès privilégié à la plateforme de bioimagerie dirigée par le Dr. Magdalena NARAJCZYK du même institut. Les souches de *D. dadantii* mutées pour *lpp* ou les gènes codant pour les enzymes responsables du couplage de Lpp au PG (*ldt03* et *ldt84*) ont été envoyées à Gdańsk pour être observées en microscopie électronique par coloration négative et en microscopie électronique à transmission (MET) (Fig. 50, 51 et 52). Les cellules ont été cultivées en milieu liquide sur la nuit à 30°C, puis observées en microscopie. Les observations de la souche sauvage ont révélé que les cellules de *D. dadantii* mesuraient entre 1 et 3 µm, avaient une forme caractéristique de bacille, et possédaient des flagelles péritriches (Fig. 50). Le mutant *lpp* possède quant à lui des cellules allongées dépassant généralement les 3 µm (Fig. 50). De plus, le mutant *lpp* présente des perturbations évidentes de l'enveloppe, notamment visibles par la formation de vésicules extracellulaires à la surface de la cellule (Fig. 50). Ce résultat témoigne de la déstabilisation de l'enveloppe en l'absence de Lpp. Par ailleurs, les cellules du mutant *lpp* semblent être moins flagellées que la souche sauvage (Fig. 50). De manière assez spectaculaire, le mutant *lpp* présente une auréole noire autour de cellules d'une nature inconnue qui pourrait être causée par la libération ou l'exposition à la surface de bactéries de certains composants. Ensemble, ces résultats démontrent les effets pléiotropiques de la délétion de *lpp* sur la structure de l'enveloppe bactérienne.

L'observation des mutants délétés de *ldt03* montre que les cellules possèdent des flagelles visiblement plus courts que ceux de la souche sauvage, même si aucune estimation statistique n'a été réalisée (Fig. 50). L'enveloppe ne semble toutefois pas être déstabilisée autant que chez le mutant *lpp* puisqu'aucune structure vésiculaire n'est observée autour des cellules (Fig. 50). Néanmoins, une auréole noire est aussi visible autour de cellules *ldt03*, même si elle n'a pas exactement le même aspect que chez le mutant *lpp*. Il est intéressant de noter que la mutation de *ldt84* engendre un phénotype assez différent de celui du mutant *ldt03*, et qui est assez similaire à celui de la souche sauvage. Chez le mutant *ldt03*, les flagelles à la surface de la cellule sont assez nombreux et longs et aucune auréole n'est visible autour des cellules (Fig. 50).

L'observation du double mutant *ldt03/ldt84* a révélé que celui-ci ne présentait pas le même phénotype que le mutant *lpp*. En effet, les flagelles à la surface de la cellule sont assez nombreux et les cellules sont significativement plus courtes que celles du mutant *lpp* (Fig. 50). Plus étonnant encore, le mutant *ldt03/ldt84* ne présente pas de vésicules de la ME à sa surface, contrairement au mutant *lpp*, bien que Lpp ne soit plus couplée chez le mutant *ldt03/ldt84* (Fig. 50 et Fig. 44.A). Ces expériences illustrent bien que *ldt03* et *ldt84* ont chacune une spécificité d'action sur Lpp, puisque l'enveloppe ne présente pas le même état général chez les mutants. Par ailleurs le défaut du couplage de Lpp au PG, en absence de *ldt03* et *ldt84*, ne provoque pas les défauts si néfastes que la suppression de *lpp* elle-

WT *lpp* 03 84 03/84

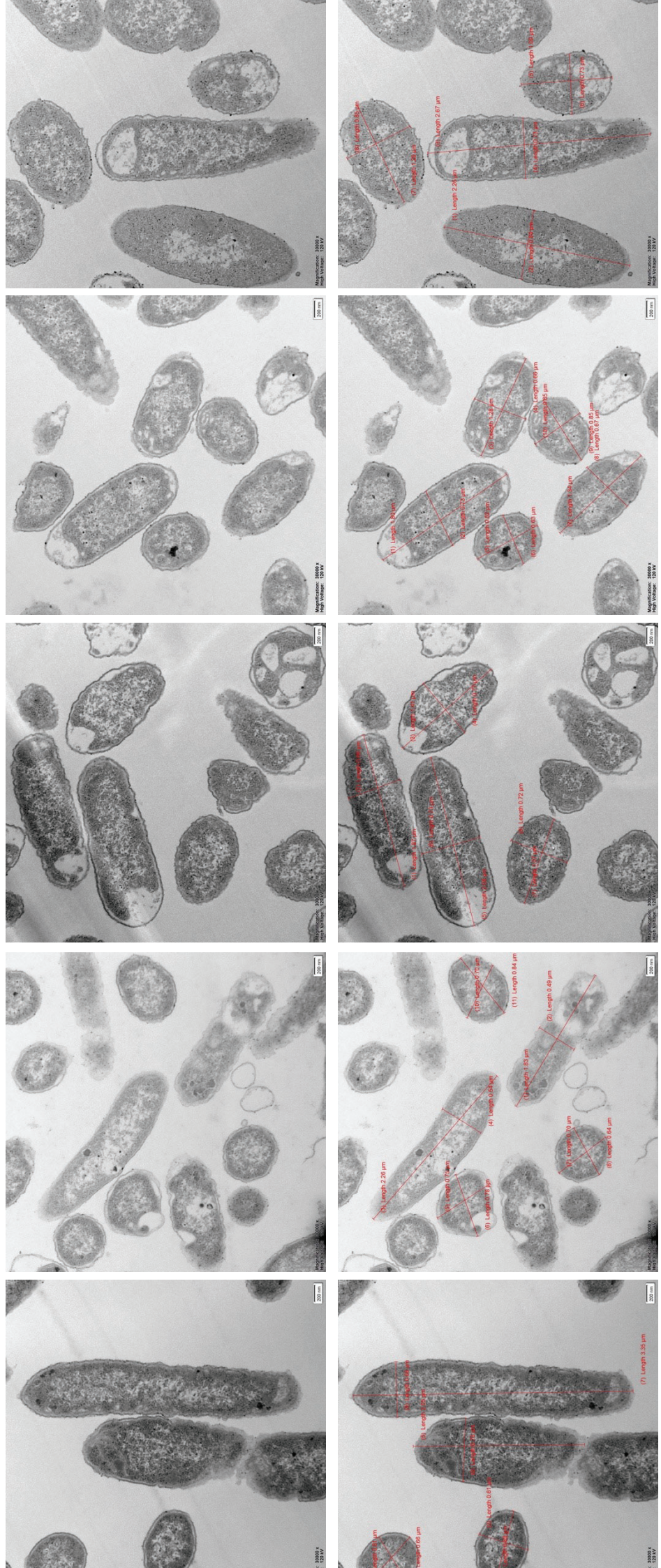


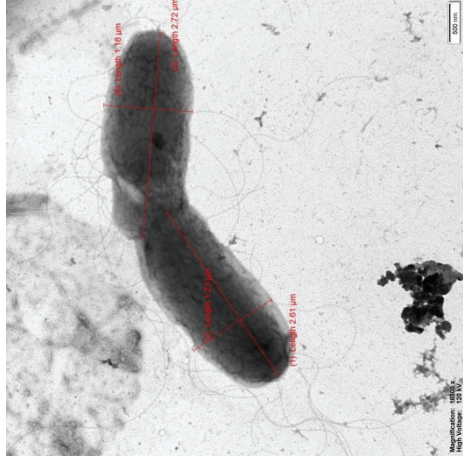
Figure 51. Ultrastructure des souches de *D. dadantii* déletées d'un ou de plusieurs gènes *lpt* et de *lpp* observées au MET. La barre d'échelle indique 200 nm.

même. Ce dernier résultat suggère que même en absence de son couplage au PG, Lpp continue de jouer un rôle stabilisateur dans l'enveloppe.

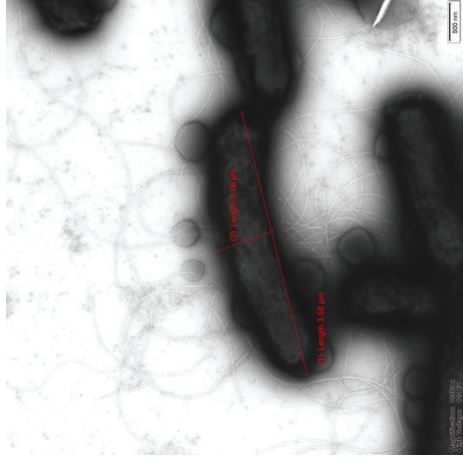
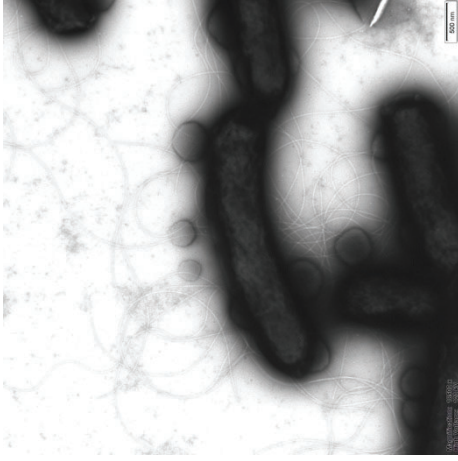
Les observations de l'ultrastructure des cellules par MET ont nécessité de figer les cellules dans une couche d'époxy, ce qui a pu légèrement modifier l'aspect général de bactéries (Fig. 51). Ce traitement a dû permettre de mieux distinguer la structure de l'enveloppe, notamment de visualiser le périplasme (Fig. 51). Les clichés MET montrent que la souche sauvage de *D. dadantii* possède une structure d'enveloppe intacte, ondulant légèrement, et un périplasme de taille régulière (Fig. 51). Comme attendu, la délétion de *lpp* engendre un élargissement du périplasme, en particulier aux pôles de la cellule, certainement dû à l'absence de couplage de Lpp pour ancrer la ME au PG (Fig. 51). Par endroits, l'enveloppe semble être moins régulière que chez la souche sauvage, et sa forme ne semble pas suivre la forme de la cellule (Fig. 51). De plus, quelques vésicules extracellulaires sont observables et même si moins nombreuses qu'en coloration négative (Fig. 50 et 51). Il est très probable que la méthode de préparation des cellules utilisée pour l'observation au MET empêche la visualisation de telles structures, y compris les flagelles. Les souches mutées pour *ldt03* et *ldt84* semblent quant à elles posséder une ultrastructure intermédiaire entre les phénotypes observés chez la souche sauvage et le mutant *lpp* (Fig. 51). L'enveloppe du mutant *ldt03* est ondulée et forme un tout plus cohérent avec la forme de la cellule, comme ce qui est observé chez la souche sauvage (Fig. 51). La largeur du périplasme semble également plus régulière tout autour de la cellule, à l'exception des pôles, tout comme le mutant *lpp* (Fig. 51). En revanche, chez le mutant *ldt84*, la largeur du périplasme semble être moins régulière que celle du mutant *ldt03* (Fig. 51). Enfin les cellules du mutant *ldt03/ldt84* présentent une largeur de périplasme moins régulière comparé à la souche sauvage, et les cellules semblent posséder le même phénotype que celles de la souche *ldt84* (Fig. 51).

Dans une autre série d'observations microscopiques, les souches de *D. dadantii* mutées pour *lpp* exprimant le vecteur vide, *lpp* sauvage, *lpp+21* ou *lppΔ21* ont également été visualisées par coloration négative (Fig. 52). Nous voulions savoir si ces versions de Lpp étaient capables de compléter totalement ou partiellement les défauts de l'enveloppe du mutant *lpp*, et également tenter de mesurer la taille du périplasme chez ces souches modulées par Lpp de taille différente. Curieusement, les clichés envoyés montrent que le mutant *lpp* possède de nombreux flagelles péritriches et ne présente pas de vésicules extracellulaires à sa surface et les cellules mesurent en moyennes 2 à 3 μm (Fig. 52). En revanche, l'expression de *lpp wt* chez le mutant *lpp* engendre l'accumulation de vésicules extracellulaires et de cellules de taille plus importante dépassant les 3 μm (Fig. 52). Il est possible que les fichiers envoyés aient été mal nommés, et que les interprétations soient faussées. En effet, les phénotypes observés sont inverses à ce qui a été précédemment observé (Fig. 51). La complémentation du mutant *lpp* avec le gène *lpp+21* engendre la présence de vésicules extracellulaires de plus petite taille que celles observées précédemment chez le mutant *lpp* ou encore chez la souche complétement avec *lpp wt* (Fig. 52). La taille des cellules est comprise entre 2 et 3,5 μm (Fig. 52). Le mutant *lpp* exprimant le variant *LppΔ21* ne présente pas de vésicules extracellulaires, mais la taille des cellules est visiblement plus petite, et les flagelles sont visiblement moins nombreux

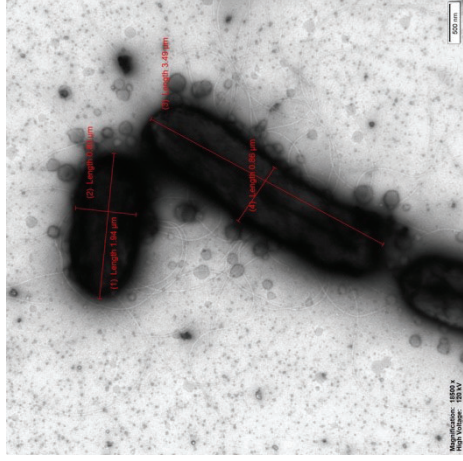
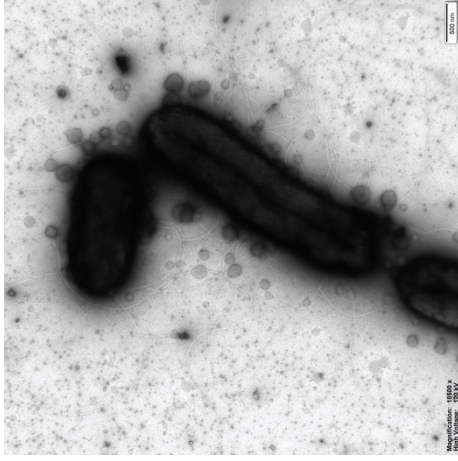
(*lpp*-)



(*lpp*-) + *lpp* wt



(*lpp*-) + *lpp*+21



(*lpp*-) + *lpp*Δ21

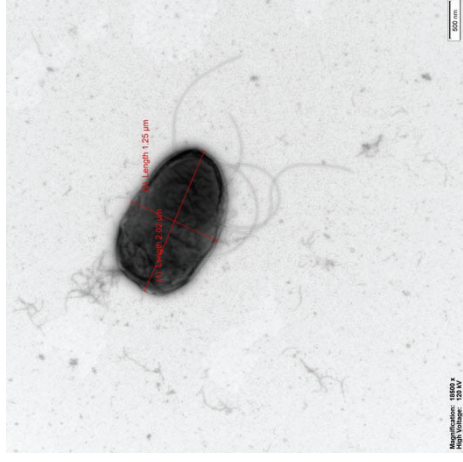
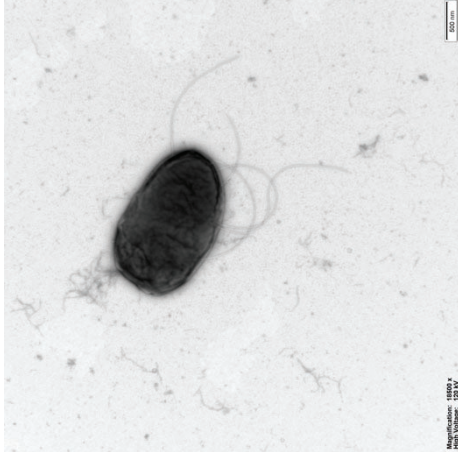


Figure 52. Observation en microscopie électronique de la souche *lpp* de *D. dadantii* complétée avec le vecteur pGEM-T vide (Ve), ou portant les gènes *lpp* wt, *lpp*+21 ou *lpp*Δ21 en coloration négative. La barre d'échelle indique 500 nm.

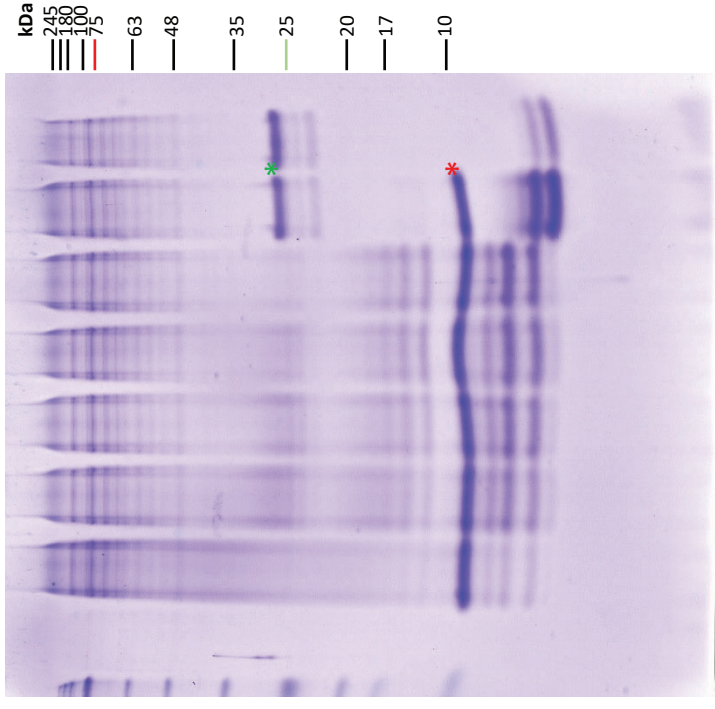
(Fig. 52). Les images de MET n'ont pas encore été obtenues pour ces constructions. L'ultrastructure de ces souches permettra de déterminer la taille du périplasme médiée par Lpp.

Ensemble ces résultats démontrent que l'enveloppe de *D. dadantii* est déstabilisée par l'absence de Lpp à la ME. Toutefois, l'absence de phénotype similaire chez le mutant *ldt03/ldt84* suggère que dans cette souche, Lpp est capable d'interagir de façon non covalente avec le PG, et ainsi de stabiliser partiellement l'enveloppe de *D. dadantii*.

B.

	0 min	3 h	10 h	24 h	Lyso (24 h)	PGRP (3 h)
Lysozyme	-	+	+	+	+	-
PGRP	-	+	-	-	-	+

PGRP (24 h) + PGRP (3 h)

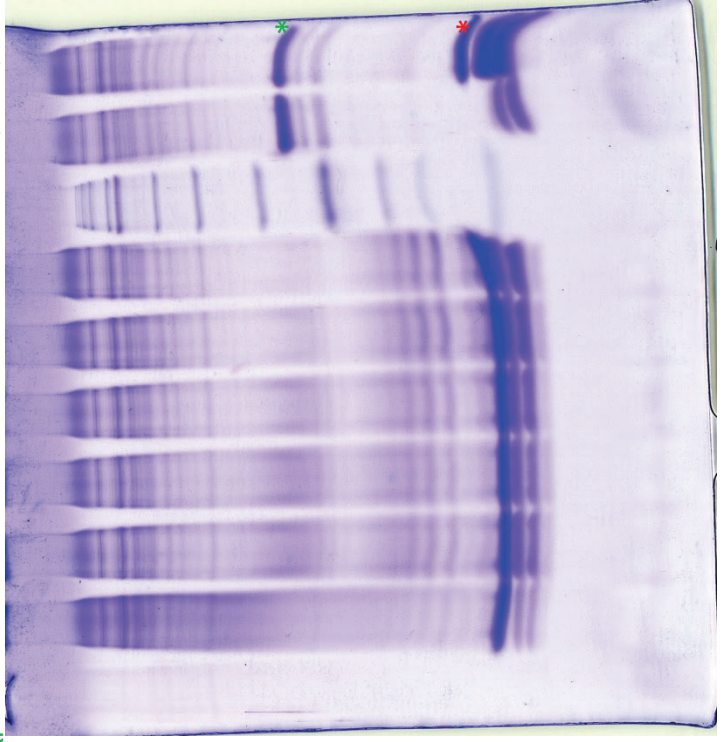


**Ildt03/Ildt84
+ Ildt84**

A.

	0 min	30 min	1 h	3 h	10 h	24 h	PGRP (3 h)	Lyso (24 h)	PGRP (3 h)
Lysozyme	-	+	+	+	+	+	-	+	-
PGRP	-	-	-	-	-	-	+	-	+

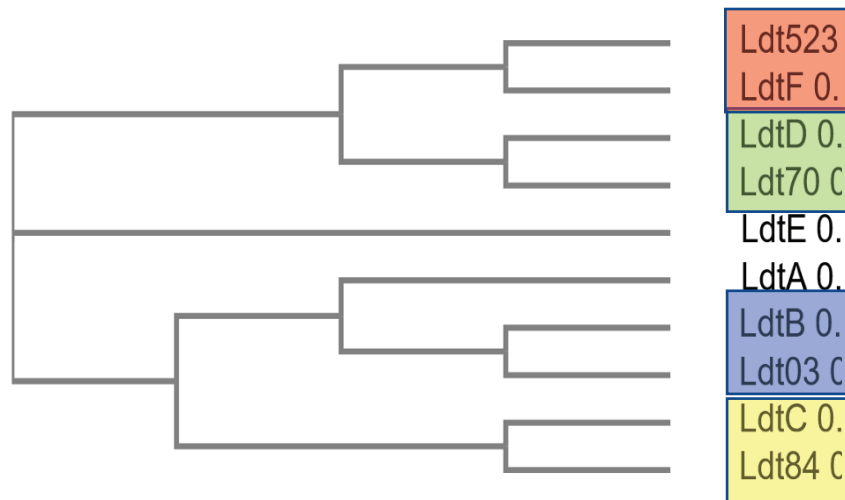
PGRP (24 h) + PGRP (3 h)



**Ildt03/Ildt84
+ Ildt03**

Figure Annexe 1. Cinétique de digestion du PG de *D. dadantii*. Le PG du double mutant *Ildt03/Ildt84* complétement soit avec *Ildt03* (A), soit avec *Ildt84* (B) a été purifié, puis digéré par le lysozyme ou PGRP. Les temps de digestion sont indiqués en haut des pistes. Les protéines libérées contenues dans les échantillons de PG digéré ont été séparées par SDS-PAGE (18 % tris-tricine), puis colorées au bleu de Coomassie. Le profil de digestion des formes de Lpp comprises de 6 à 20 kDa sont stables à partir de 3h de digestion par le lysozyme. A partir de 3h et jusqu'à 24h, les formes de Lpp de poids moléculaire (25 -35 kDa) sont progressivement digérées par le lysozyme.

A.



B.

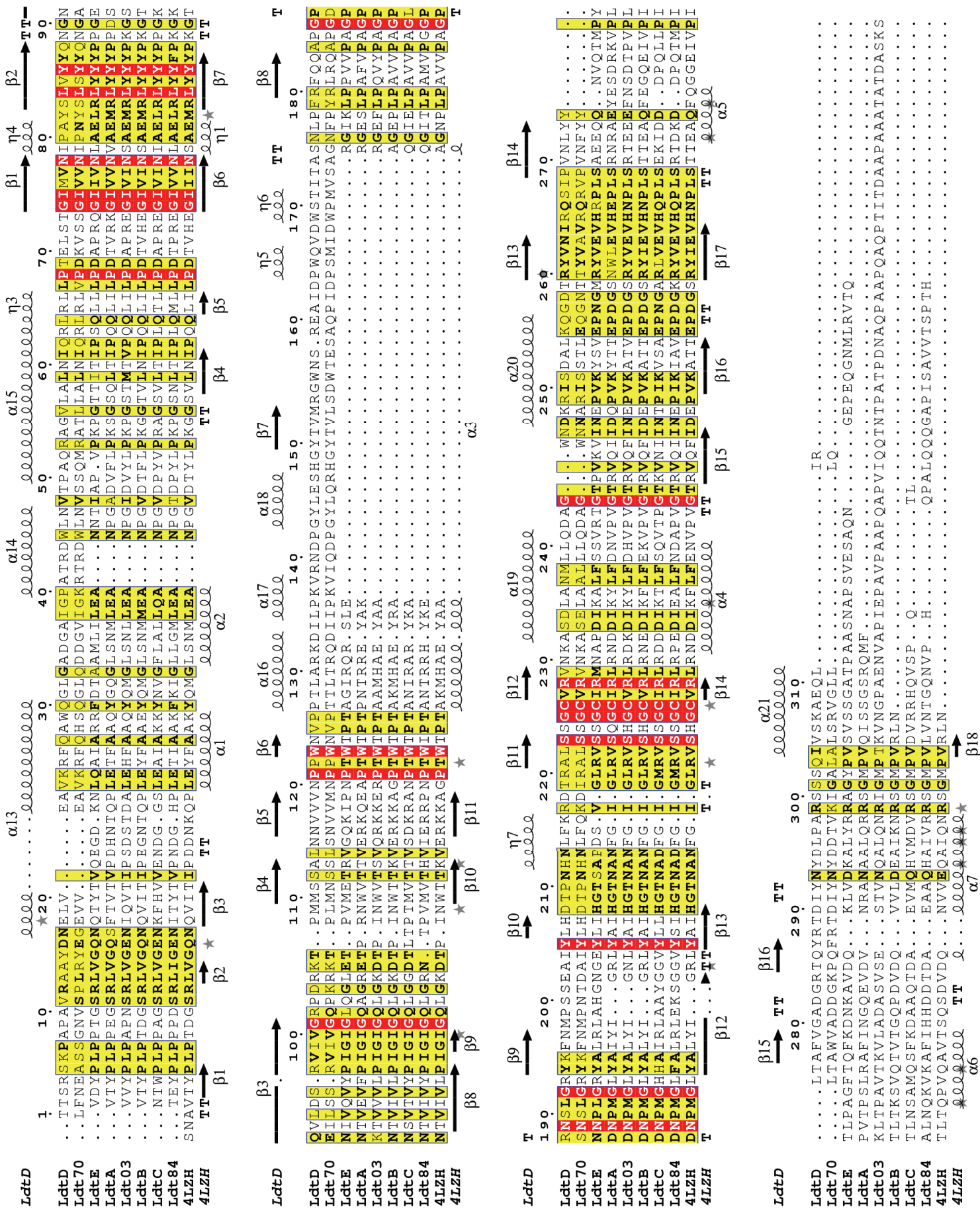
	511		531	*		551
Ldt70	NTDAIYLHDT	PNHNLFOKDI	RALSSGCVRV		NKASELAALL	LQ-----DAG
LdtD	SSEAIYLHDT	PNHNLFKRDT	RALSSGCVRV		NKASDLANML	LQ-----DAG
Ldt03	--GNLYAIHG	TNAN-FGIGL	R-VSHGCVRL		-RDKDIKYL	DHVPVGTRVQ
LdtB	--GRLYAIHG	TNAN-FGIGL	R-VSHGCVRL		-RNEDIKFL	EKVPVGTRVQ
Ldt84	KSGGVYSIHG	TNAD-FGIGM	R-VSSGCIRL		-RPEDIEALF	NDAPVGTRVQ
LdtA	--GRLYAIHG	TNAN-FGIGL	R-VSQCIRL		-RNDDIKYL	DNVPVGTRVQ
LdtC	AYGGVYLLHG	TNAD-FGIGM	R-VSSGCIRL		-RDDDIKTL	SQVTPGTKVN
LdtE	HGNGEYLIHG	TSAP-DSVGL	R-VSSGCIRM		-NAPDIKALF	SSVRTGTPVK
Ldt523	-----MIHG	EC-----	--VSIHCYAM		-TNQYIAEY	TYVEKALRNG
LdtF	-----MIHG	DC-----	--VSIHCYAM		-TNQIDEIF	QFVTGALVFG

C.

<i>D. dadantii</i>	Longueur	Site catalytique	Domaine PG	Substrat	Spécificité enzymatique	Activité (phosphate)	Efficacité couplage Lpp
Ldt70	562 CVR		PG	PG	-	?	-
Ldt03	365 CVR		-	Lpp	Monomère	Oui	100%
Ldt84	332 CIR		LysM	Lpp	Dimère	Non	100%
Ldt523	241 CYA		-	Lpp	-	?	-

<i>E. coli</i>	Longueur	Site catalytique	Domaine PG	Substrat	Spécificité enzymatique	Activité (phosphate)	Efficacité couplage Lpp
LdtD (YcbB)	615 CVR		PG	PG	-	?	-
LdtB (YbiS)	306 CVR		-	Lpp	Monomère	Non	100%
LdtC (YcfS)	320		LysM	Lpp	Monomère ?	Non	5%
LdtE (YnhG)	334 CIR		PG	PG	-	?	-
LdtA (ErfK)	310		-	Lpp	Dimère	Oui	100%
LdtF ou DpaA (YafK)	246 CYA		-	Lpp	-	?	-

Figure Annexe 2. A. Arbre phylogénétique des Ldt d'*E. coli* et de *D. dadantii*. Arbre obtenu par la méthode du maximum de vraisemblance, avec un Bootstrap de 100. **B. Alignement Muscle des résidus avoisinant le site catalytique des Ldt d'*E. coli* et de *D. dadantii*.** La cystéine catalytique est indiquée par un astérisque. **C. Tableau récapitulatif des caractéristiques des Ldts de *D. dadantii* et d'*E. coli*.** La couleur rouge a été utilisée pour les endopeptidases. L'efficacité de couplage de Lpp par les Ldts a été estimée à partir de la Figure 46.A.



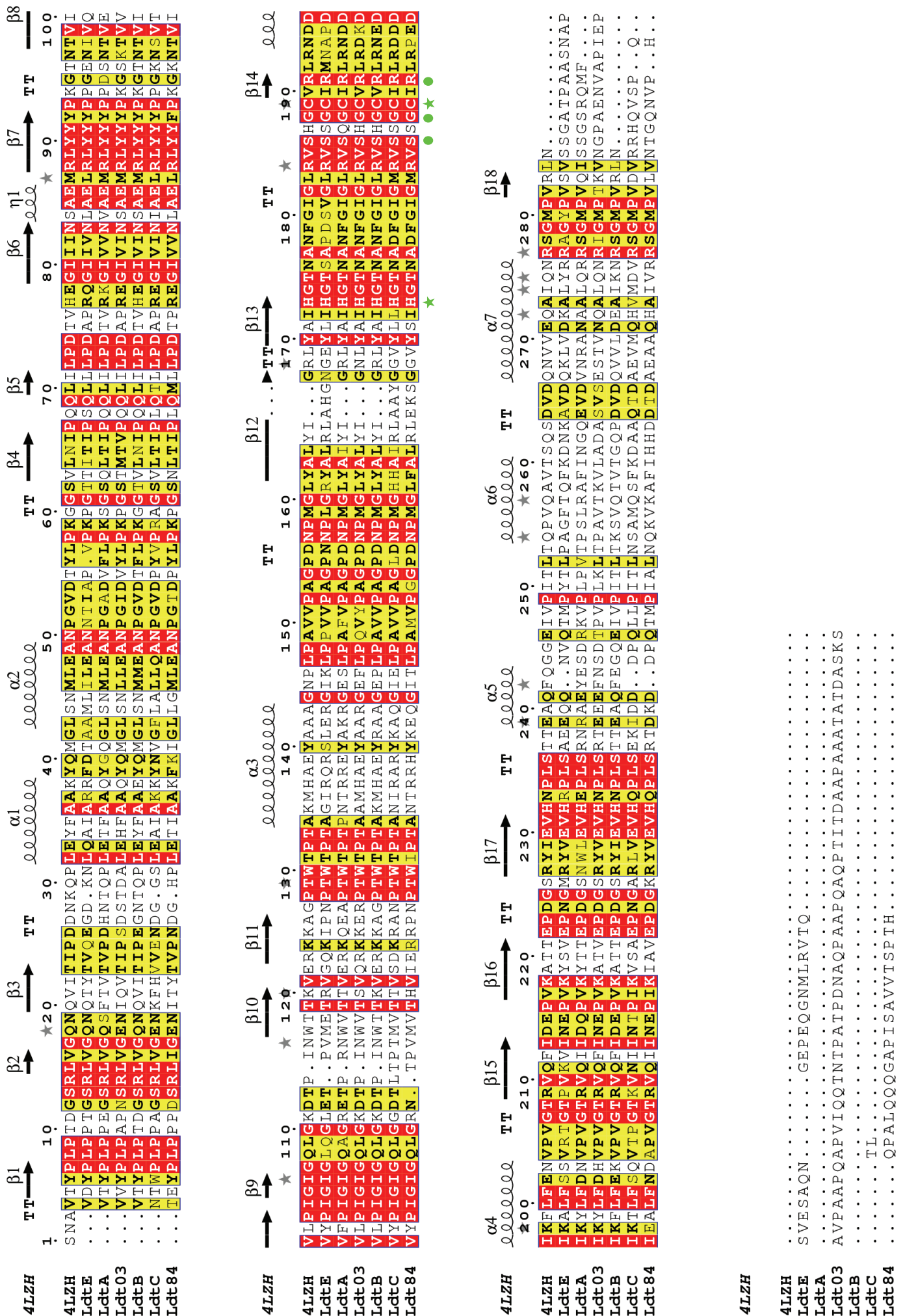
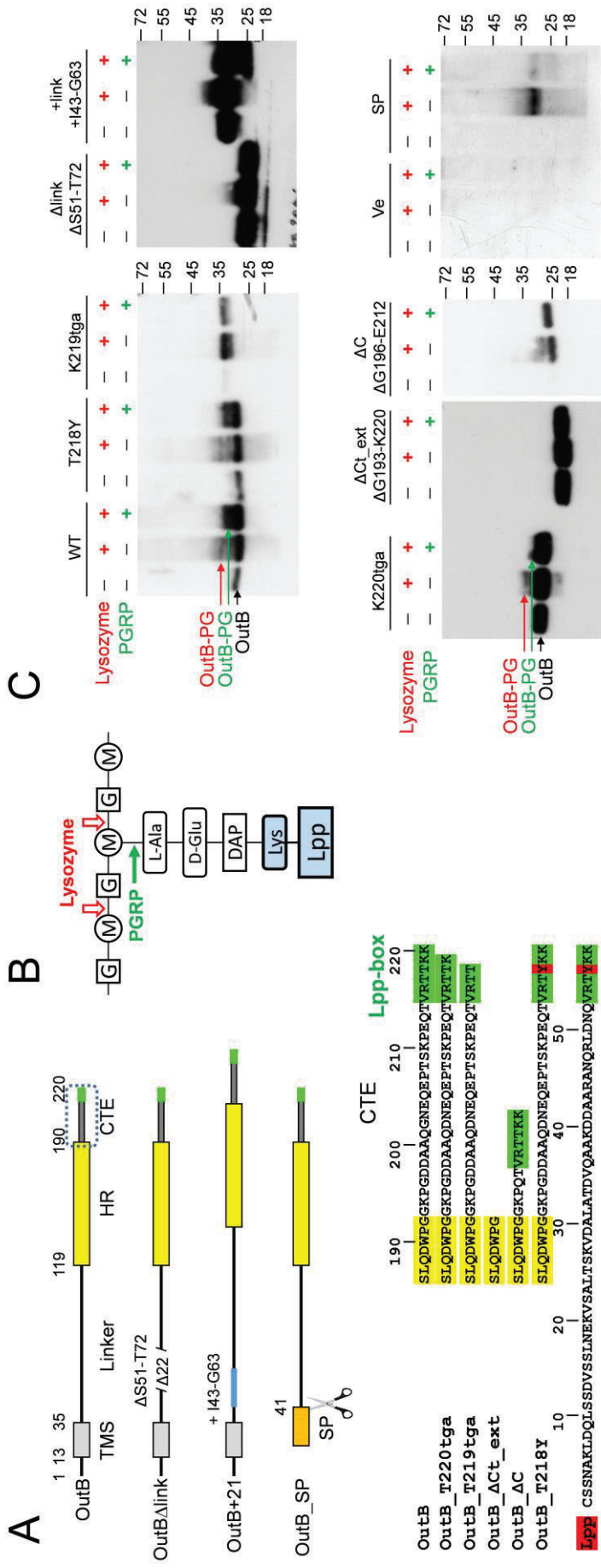


Figure Annexe 4. Alignement des séquences représentatives des Ldts de *D. dadantii*, *d'E. coli* et de *K. pneumoniae* (4LZH, homologue de LdtB (Ybis)). LdtD réalise la réticulation du PG chez *E. coli*, tandis que Ldt A, LdtB, LdtC, Ldt03, Ldt84 et 4LZH réalisent le couplage de Lpp au PG chez *D. dadantii*, *d'E. coli* et de *K. pneumoniae*. L'alignement multiple a été réalisé avec Clustal Omega (ebi.ac.uk) et le serveur ESPript. Les groupes de résidus identiques sont surlignés en rouge et les résidus similaires sont en jaune.



Publication

Introduction

The envelope of Gram-negative bacteria, also called/termed as diderms or diderms with lipopolysaccharides (LPS-diderms), is comprised of two membranes, the inner and outer membranes, IM and OM, respectively (3,+). The periplasm, an aqueous extra-cytoplasmic compartment situated between these two membranes, contains a thin layer of peptidoglycan (PG) as well as an array of enzymes, permiases, chaperons and a variety of transport systems crossing the cell envelope (Ref). Peptidoglycan is a continuous mesh-like polymer that consists of extended glycan chains made of alternating residues of *N*-acetylglucosamine and *N*-acetylmuramic acid linked by β -1,4-bonds. The lactyl group of *N*-acetylmuramic acid residues is usually substituted by a pentapeptide stem that in *E. coli* has L-Ala₁-D-Glu₂-*m*DAP₃-D-Ala₄-D-Ala₅ sequence, where *m*DAP is a *meso*-diaminopimelic acid (10+Ref). The stem peptides are cross-linked together either as D-Ala₄→*m*DAP₃ or *m*DAP₃→*m*DAP₃ by D,D-transpeptidases or L,D-transpeptidases, respectively (Ref).

A proper attachment of peptidoglycan layer to the outer and inner membranes is essential for the integrity of cell envelope and several specialized proteins and protein complexes perform/accomplish this function /are implicated in this process. In many γ -proteobacteria, such as the paradigmatic laboratory model *E. coli*, the Braun's lipoprotein, also termed as Lpp, tethers the OM to the PG layer (4,5). The lipidated N-terminus of Lpp is embedded/ anchored into the outer membrane, while the C-terminal lysine residue of Lpp is covalently linked to the *m*DAP residue of peptide stem by specialized L,D-transpeptidases (Ref). In this way, Lpp forms a trimeric helix attaching the OM to the PG layer. In parallel, a beta barrel outer membrane protein OmpA anchors non-covalently the OM to the PG, via the periplasmic PG-binding domain of OmpA (1,2). Finally, the Tol-Pal system, a trans-envelope complex composed of five proteins, constitutes a network linking the peptidoglycan layer with/to the outer and inner membranes (5+8Ref). Several other proteins carrying specialized PG-binding domains of various types (LysM, AMINN, OmpA-like etc.) are non-covalently attached to the PG in Gram-negative bacteria (ref). In this way, the peptidoglycan layer plays an important protective role but acts also as a matrix for a non-covalent attachment of some periplasmic and membrane proteins. Until lately, Lpp has remained the only known protein in Gram-negative bacteria covalently linked to the PG. Yet, the recent studies have identified that in certain α - and γ -proteobacteria, which do not possess an *lpp* ortholog, some β -barrel outer membranes proteins (OMPs) are covalently attached via their N-terminal Ala or Gly residues to the *m*DAP residue of stem peptide (6,7). These OMPs represent/exemplify an alternative mechanism of stabilization and attachment of OM to the peptidoglycan cell wall.

In all the reported/known examples of covalent linkage cited above, both Lpp and OMPs are numerically very abundant proteins (e.g. $\sim 10^6$ copies per cell of Lpp) that play a structural role by tethering the OM to the PG hence, stabilizing the cell envelope. Here we show that an inner membrane protein OutB of *Dickeya dadantii* is covalently linked to the stem peptide of PG by the same molecular mechanism as Lpp. Contrary to very abundant Lpp and OMPs, OutB is moderately expressed ($\sim 10^2$

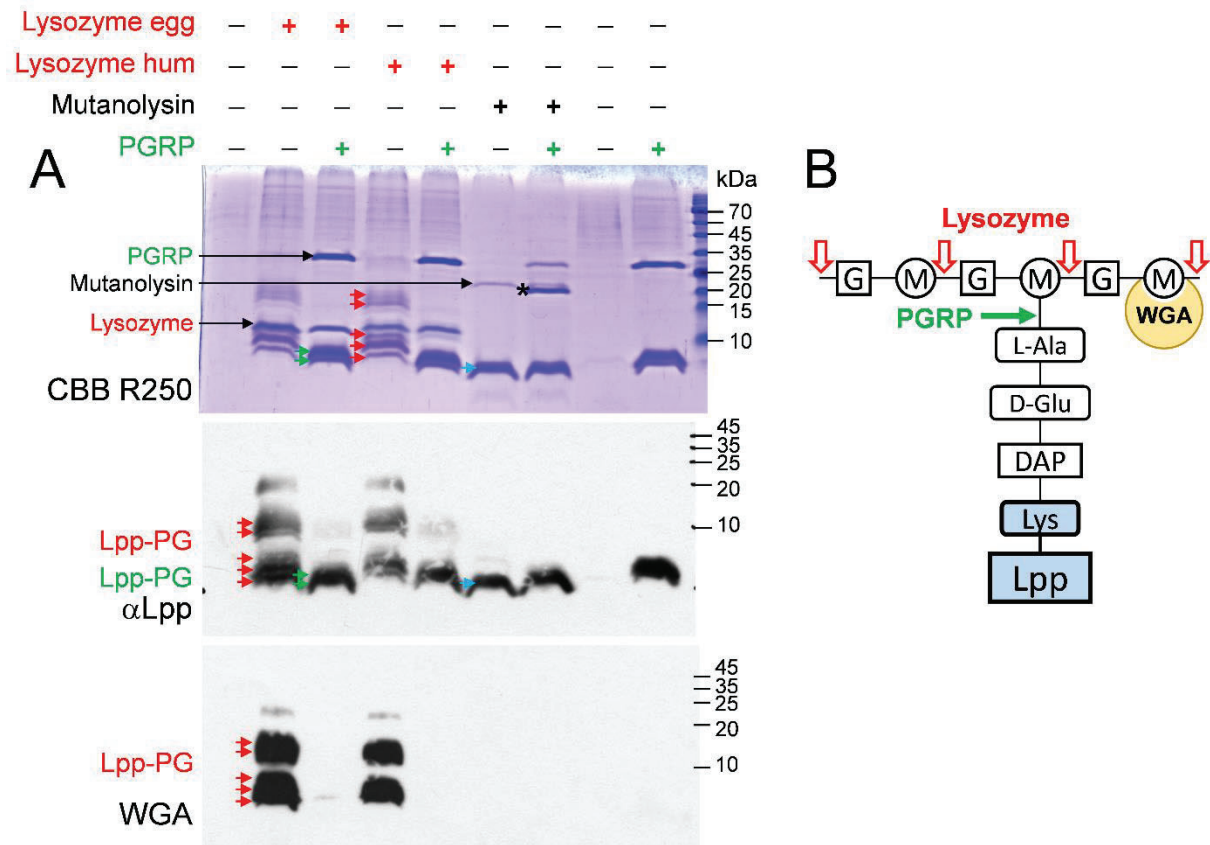


Figure 2 “Lpp diff enz Ig&WGA”. The PG-acting enzymes generate various Lpp-PG specie. **A.** The peptidoglycan from *D. dadantii* wild-type strain was digested or not with the lysozyme (egg or human), or PGRP amidase, or mutanolysin and separated on SDS-PAGE. The gel was either stained with Coomassie R250 or analyzed by Western blot with anti-Lpp or WGA. The positions of Lpp-PG derivatives generated by the lysozyme, PGRP amidase and mutanolysin are indicated with red, green and blue arrows, respectively. Note that PGRP and mutanolysin cut off the glycan moieties reactive with WGA. Mutanolysin (Sigma-Aldrich M9901) contains a mixture of muramidases and amidase and exhibits some proteolytic activity. An asterisk shows a truncated derivative of PGRP generated by mutanolysin. **B.** Schematic of action of the lysozyme and the PGRP amidase on Lpp bound to PG. Wheat germ agglutinin (WGA) recognizes N-acetyl-D-glucosamine.

copies per cell) and utilizes/uses the PG as a matrix to better attach itself and the related secretin pore to the bacterial envelope.

Results

The inner membrane protein OutB is covalently linked to the PG.

Our previous study has showed that a component of *D. dadantii* T2SS, the IM protein OutB, is attached to the PG (0). Particularly, *in vivo* cross-linking experiments have suggested that a 28 residue-long, C-terminal extension (CTE) of OutB is essential for and/or directly involved in the interaction with the PG. The CTE of OutB shares some common features with sugar-binding motifs but it does not belong to any known family of PG-binding domains (Ref). Yet, the inspection of its sequence shows that the six-residue long C-terminal sequence of OutB CTE is identical to that of the Braun's lipoprotein Lpp, except for the third from last residue is threonine in OutB instead of tyrosine in Lpp (Fig. 1).

Since the C-terminal lysine of Lpp is covalently linked to *m*DAP residue of stem peptides, we examined if OutB could also be/is covalently attached to PG similarly to that of Lpp. In this order, the PG of *D. dadantii* was purified and digested with the muramidase (egg lysozyme), which cleaves the glycosidic bonds (between N-acetyl-D-glucosamine and N-acetylmuramic acid residues) of glycan chains (Fig. 2). Western blot analysis of this sample revealed, in addition to 'free' form of OutB, one or two less quickly migrating OutB species (Fig. 3). These adducts could correspond to OutB linked to the remaining PG moieties. To test this hypothesis, the PG was digested with the PGRP amidase from **XX**, which cleaves the amide bond between N-acetylmuramic acid and L-Ala of peptide stem (Ref). Therefore, it may be expected that PGRP could/will release OutB linked to the peptide stems only (Fig. 2). Accordingly, the apparent mass of OutB adduct generated by PGRP was lower than/as compared to those generated by the lysozyme (Fig. 3).

To better assess the validity/reliability of these data, we analyzed the Lpp patterns/forms generated by the lysozyme and PGPR. Four main protein bands reactive with Lpp-antibodies were released from the *D. dadantii* PG by lysozyme (Fig. 4, Lpp-PG1 to Lpp-PG4). Treatment of PG with the PGRP amidase generated two anti-Lpp reactive specie of lower apparent masses, consistent with the removal of glycosyl moieties from the Lpp-PG1 to Lpp-PG4 specie (Fig. 4). To corroborate this assumption, the Lpp-PG adducts generated by lysozyme and PGRP were probed with the wheat germ agglutinin (WGA), which recognizes/interacts with the N-acetyl-D-glucosamine residues of PG. As expected, WGA bound to Lpp-PG species generated by the lysozyme, but did not to those produced by PGRP (Fig. 4). Unfortunately, a similar WGA-based assay was not relevant/illustrative with OutB because of intense smears generated by the much more abundant Lpp specie.

Enzymes of *D. dadantii* implicated in the covalent attachment of Lpp to PG.

E. coli encodes six proteins carrying an YkuD-type catalytic domain (PF03734), a distinctive feature of known L,D-transpeptidases. These enzymes fulfill three major roles in remodeling of PG, i) 3-3 cross-

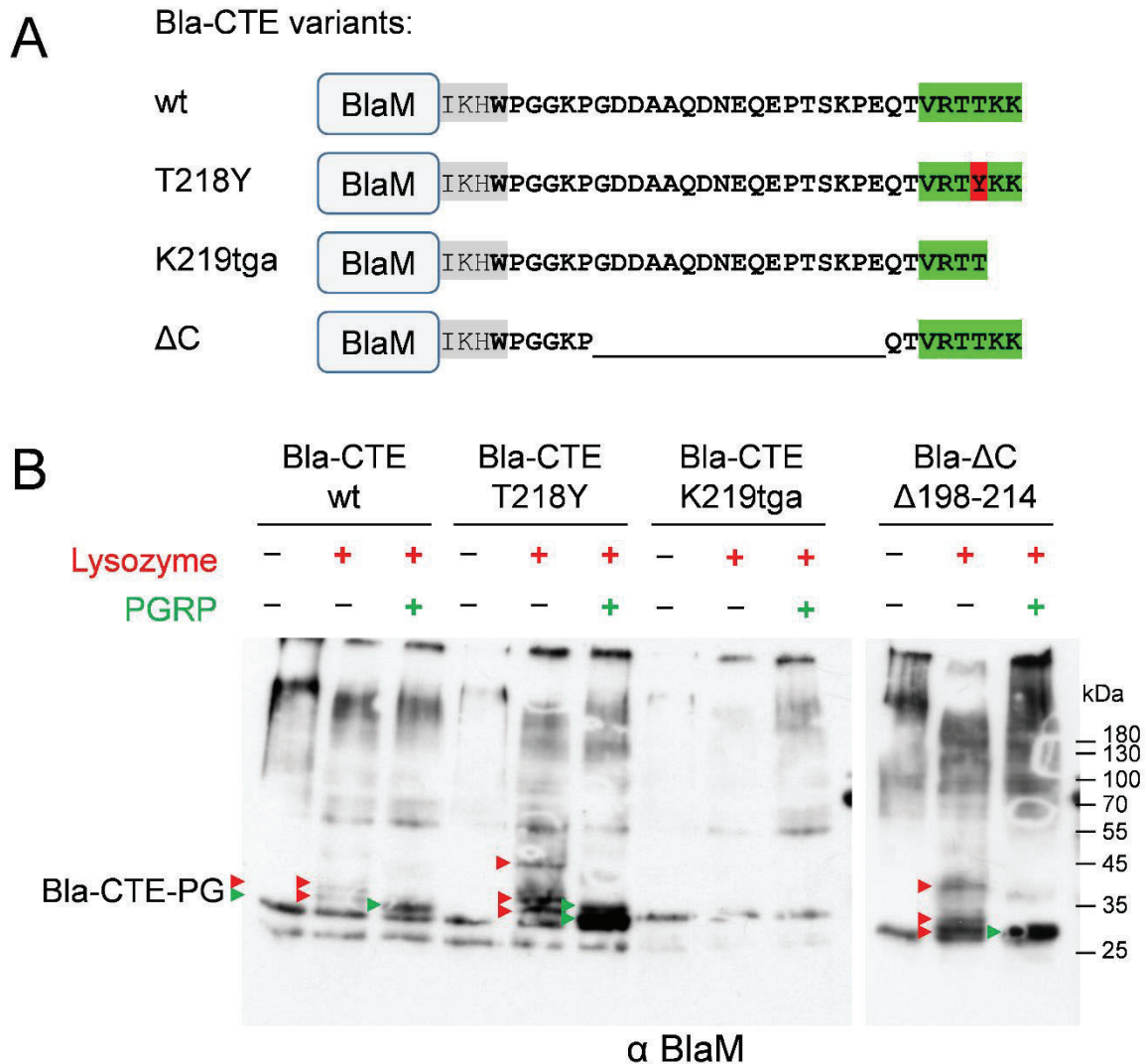


Figure 3. **Bla-CTE**. BlaM fused to the C-terminal extension of OutB is covalently attached to the PG. **A**. Schematic of the used BlaM-OutB fusions. The C-terminus of BlaM is highlighted in grey; the rest of sequence corresponds to OutB (from W190 to K220). The Lpp-like box is in green and the T218Y substitution is in red. **B**. The peptidoglycan from *D. dadantii* A5652 cells expressing the BlaM-OutB fusions shown in 'A' was extracted, washed, digested with either lysozyme or lysozyme plus PGRP amidase and analyzed by immunoblotting with anti-BlaM antibodies. The positions of BlaM-OutB fusions and their derivatives linked to PG moieties generated by the lysozyme and the PGRP amidase are indicated with red and green triangles, respectively.

linking of stem peptides, LdtD (YcbB) and LdtE (YnhG), ii) the covalent linking of Lpp to the stem peptide, LdtA (ErfK), LdtB (YbiS) and LdtC (YcfS), and iii) the cleavage of the latter bond between the Lpp and stem peptide, LdtF (YafK) (11+Ref). Analysis of *D. dadantii* 3937 genome (asap.genetics.wisc.edu) reveals the presence of four genes encoding putative Ldt orthologues, ABF-0016403, ABF-0020084, ABF-0020070 and ABF-0046523, hereinafter referred to as *ldt03*, *ldt84*, *ldt70* and *ldt23*, respectively. Ldt03 and Ldt84 have/share a highest similarity/homology with the L,D-transpeptidases LdtA, LdtB and LdtC of *E. coli* that fulfill the attachment of Lpp to PG, while Ldt70 is similar to LdtD (YcbB) that accomplishes the 3-3 cross-linking of stem peptides (fig. Oa) (ref). //Interestingly, *ldt84* of *D. dadantii* shares the gene synteny with *ldtE* (*ynhG*) of *E. coli*; the both *ldt* genes are collocated with the *lpp* gene. Yet, the closest homologs of Ldt84 are LdtA and LdtB that attach Lpp to PG in *E. coli*, while LdtE is involved in the 3-3 cross-linking of peptide stems (Ref). As to the *ldtA* and *ldtB* genes, they are located into two distinct sites of *E. coli* genome and do not share synteny with any *ldt* gene of *D. dadantii*.

To examine the function of these putative Ldt, mutant *D. dadantii* strains carrying a single mutation in each *ldt* gene were constructed. PG was purified from these strains, digested with lysozyme and analyzed by SDS-PAGE and Western. The Lpp patterns produced by *D. dadantii* Δ *ldt70* and Δ *ldt23* single mutants were very similar to those of the wild-type strain, although/while the relative amount of observed Lpp-PG specie was somewhat higher in Δ *ldt23* mutant strain (Fig. 6A). In contrast, *D. dadantii* Δ *ldt03* and Δ *ldt84* single mutants produced the Lpp patterns slightly/apparently different between them both and from that of the wild-type strain (Fig. 6A). Notably, certain Lpp-PG specie characteristic of/present in the wild-type strain were absent or significantly diminished in Δ *ldt03* and Δ *ldt84* single mutants. In the double Δ *ldt03* Δ *ldt84* mutant strain, no Lpp covalently linked to the PG was detected. These data indicate that both Ldt03 and Ldt84 are implicated in the cross-linking of Lpp to the PG. It seems also likely that Ldt23, a homologue of LdtF (YafK), the enzyme cleaving the amide bond between Lpp and stem peptide (11), acts as an antagonist of Ldt03 and Ldt84.

To further evaluate the relevance of *D. dadantii* Ldt for covalent bonding of Lpp to PG, a series of strains carrying various combinations of double and triple mutations of *ldt* genes was constructed. The mutant strains that combine Δ *ldt03* or Δ *ldt84* mutation with Δ *ldt70* produced the Lpp-PG patterns very similar or identical to those of the corresponding single Δ *ldt03* and Δ *ldt84* mutants (Fig. 6A). The combination of the two latter mutations with Δ *ldt23* cause some increase in the amount of the detected Lpp-PG specie. As can be expected, no Lpp-PG species was detected in the triple Δ *ldt03* Δ *ldt84* Δ *ldt70* and Δ *ldt03* Δ *ldt84* Δ *ldt23* mutant strains (Fig. 6A). In another attempt, the *ldt* genes of *D. dadantii* were expressed from a plasmid in *D. dadantii* Δ *ldt03* Δ *ldt84* double mutant. An ectopic expression of *ldt03* in this strain generated an Lpp-PG pattern very similar to that in the *D. dadantii* Δ *ldt84* mutant (Fig. S1). Inversely, expression of *ldt84* produced an Lpp-PG pattern very similar to that in the *D. dadantii* Δ *ldt03* strain.

Taking together, these data show that both Ldt03 and Ldt84 fulfill covalent bonding of Lpp to the PG and each of these two enzymes has a particular specificity towards the PG-linking site. Ldt23 seems to play as an antagonist of Ldt03 and Ldt84, while Ldt70 more probably acts as LdtD of *E. coli* and

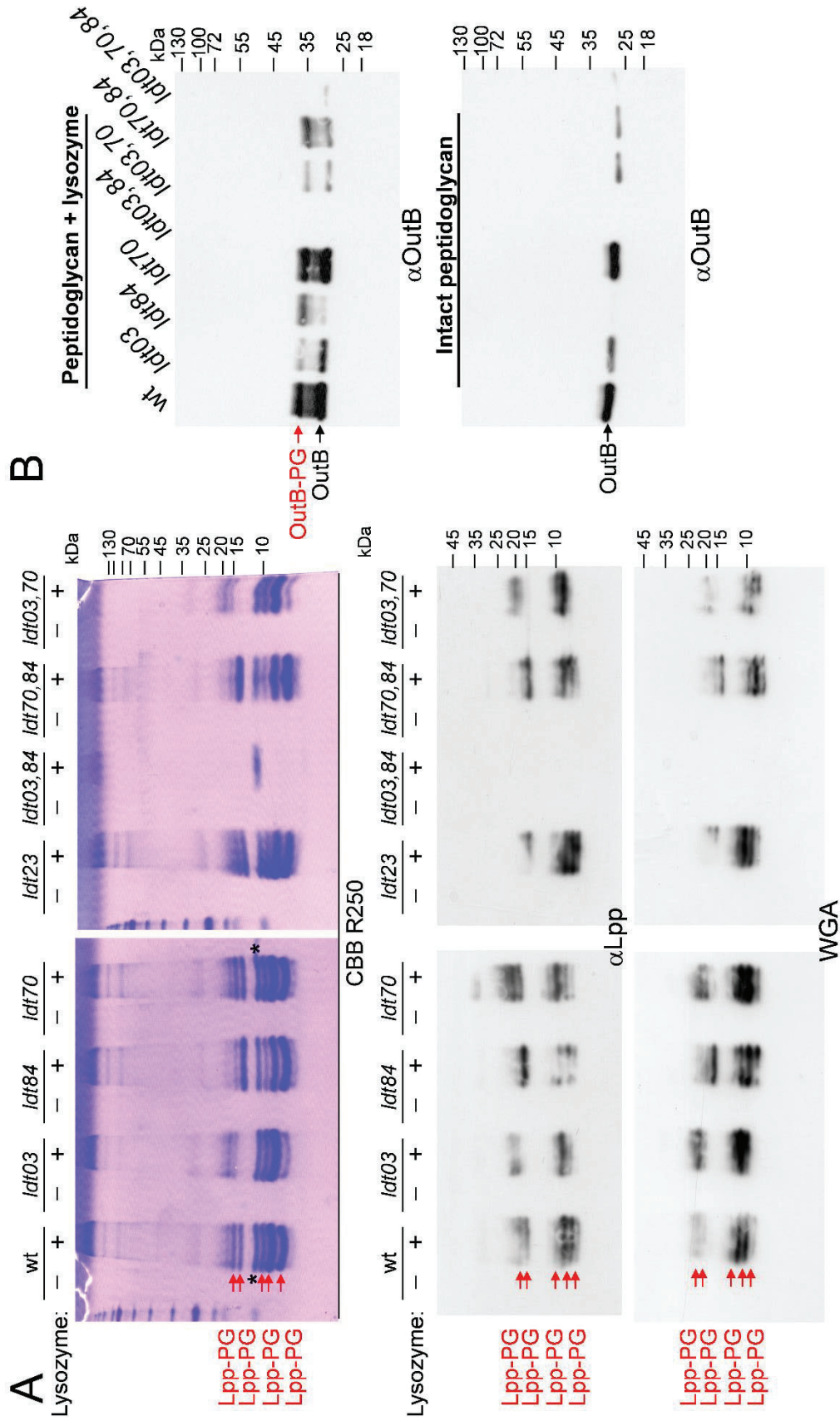


Figure 5 “*D. dadantii* ldt mutants”. The L,D-transpeptidases Ldt03 and Ldt84 are required for the covalent attachment of Lpp and OutB to PG. **A.**

Peptidoglycan from *D. dadantii* wild-type and Δ ldt mutant strains was digested with lysozyme (+) or undigested (-), separated on SDS-PAGE and stained with Coomassie R250 (top), or probed with either anti-Lpp antibodies (middle) or WGA (bottom). **B.** The same peptidoglycan samples were probed with anti-OutB antibodies. The Lpp and OutB species bound to PG moieties are indicated with the red arrows and lysozyme with an asterisk.

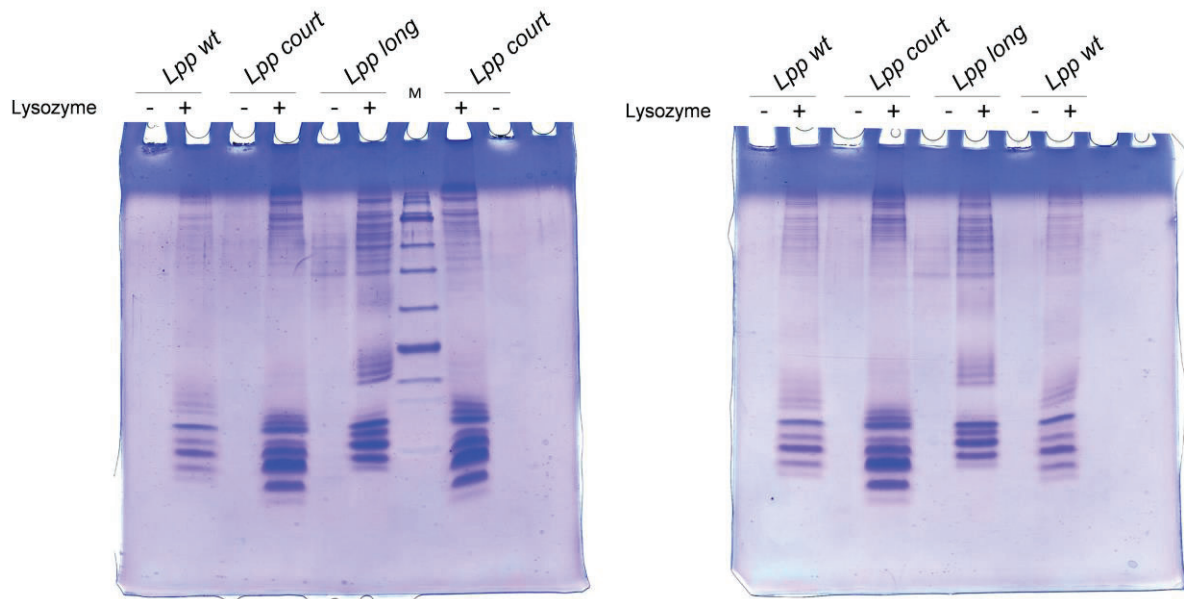
performs 3-3 cross-linking of stem peptides; the absence of Ldt70 did not obviously/apparently affects the efficiency of Lpp-PG bonding by Ldt03 and Ldt84.

L,D-transpeptidases of *D. dadantii* implicated in the covalent attachment of OutB to PG

The PG samples purified from *D. dadantii* strains lacking various *ldt* genes were next analyzed for the presence of OutB specie bound to PG (PG-bound OutB specie). Markedly, the observed OutB-PG patterns follow roughly the same trends/tendency/variations as those of Lpp (Fig. 6B). More precisely, suppression of *ldt03* or *ldt84* caused an obvious diminution of certain OutB-PG species, but not the same for both mutants. Consequently, deletion of both *ldt03* and *ldt84* provoked a complete loss/disappearance of any PG-bound OutB forms (Fig. 6B). Conversely, an ectopic expression of *ldt03* or *ldt84* in the wild-type strain increased the amount of PG-bound OutB. Deletion of *ldt70* did not apparently alter the observed OutB-PG patterns in any tested parental strains, in either wt, or *ldt03*, or *ldt84*, or *ldt03 ldt84* (Fig. 6B). Yet, deletion of *ldt23* caused a some increase in the amount of PG-bound OutB. These data show/suggest that the covalent linking of OutB to PG is accomplished by the same enzymes as for Lpp, namely by Ldt03 and Ldt84.

Regions of OutB implicated/essential for its attachment to PG

In *E. coli*, the Lpp is attached to the peptide stem through the C-terminal lysine residue. Precisely, the ϵ -amino group of side chain of lysine forms an amide bond with the α -carboxyl group of *m*-DAP (Ref). In *D. dadantii*, the C-termini of Lpp and OutB possess two residues of lysine in place of Arg-Lys sequence in the Lpp of *E. coli* (Fig. 1). We therefore evaluated possible involvement of these two C-terminal lysine residues in covalent bonding of OutB to PG. //or To evaluate possible involvement of these two C-terminal lysine residues in covalent bonding of OutB to PG, they were removed one by one (corresponding codons were substituted by an Opal stop codon)//. As well as can be expected, the removal of both C-terminal lysine residues prevents the attachment of OutB to PG (Fig. 7). Yet surprisingly, the OutB variant lacking the only one C-terminal lysine, OutB_Δ220K, remains linked to PG, apparently as efficiently as /at the similar level as the wild type OutB (Fig. 7B). This suggests that OutB could be linked to PG through the remaining penultimate lysine residue. Similarly, suppression of the last C-terminal lysine residue from the *D. dadantii* Lpp (Lpp_Δ58K) did not completely block/prevent its attachment to PG. Yet in this case, the amount of mutant Lpp_Δ58K covalently linked to PG was significantly lower as compared with the wild type Lpp (Fig. 8). Since the only difference between/in the six residue-long C-terminal sequences of OutB and Lpp of *D. dadantii* is the third from last residue (Thr vs Tyr, respectively), Y56 in Lpp_Δ58K was substituted with a threonine. The generated Lpp_Y56T/Δ58K was bonded to PG more amply/massively than Lpp_Δ58K (Fig. 8). These data suggest that in the context of the shortened Lpp and OutB lacking the C-terminal lysine, the VRTTK C-terminal sequence enables/leads to a better linkage to PG as compared to the VRTYK sequence. Conversely, in the context of the full-length OutB, replacement of T218 with a tyrosine results to a better attachment of the generated OutB_T218Y variant as compared with the wild-type OutB (Fig. 7). Consistent with the latter, Lpp_Y56T variant was bonded to PG less amply than the wild-type Lpp (Fig.



Supplementary figure 1. “**Lpp long et court**” Lpp-PG patterns generated by the Lpp variants of different lengths. *D. dadantii* Δlpp strain was complemented with a plasmid carrying either *lpp_wt*, or *lpp Δ 21* or *lpp+21*. Peptidoglycan from these cells was extracted, washed, digested with lysozyme, separated on SDS-PAGE and stained with Coomassie G250. **Lpp specie linked to PG moieties (Lpp-PG1 to Lpp-PG4) are indicated with arrows.** Note the apparent size of Lpp-PG specie generated by the different Lpp variants vary accordingly to their molecular masses.

8). Taking together, these data show that the Lpp/OutB PG-linking box/motif is flexible enough and allows the protein linkage to PG through both, the ultimate or penultimate lysine residue and that the nature of the third from last residue (Thr vs Tyr) controls the efficiency of these bonding.

The Lpp from *E. coli* and those from many other enterobacteria are ended by an RK sequence. The side chain of arginine possesses a guanidinium group that has a lower/different reactivity towards the carboxyl groups of amino acids or *m*DAP, as compared to the ϵ amino group of lysine. We nevertheless wonder if the penultimate arginine residue of *E. coli*-like Lpp could also be covalently bonded to *m*DAP of stem peptides. To this end, we generated Lpp variants carrying an arginine residue in the place of the penultimate lysine. As can be expected Lpp_K57R variant was efficiently linked to PG, yet/while the pattern of the generated Lpp-PG forms was slightly different from that of the wild-type Lpp (Fig. 8). Analysis of the PG of two shortened variants, Lpp_K57R_ΔK58 and Lpp_Y56T_K57R_ΔK58 did not detect any PG-bound Lpp specie (Fig. 8). It seems therefore likely that in the *E. coli*-like Lpp, the C-terminal lysine is the only residue to be covalently linked to the PG stem peptides.

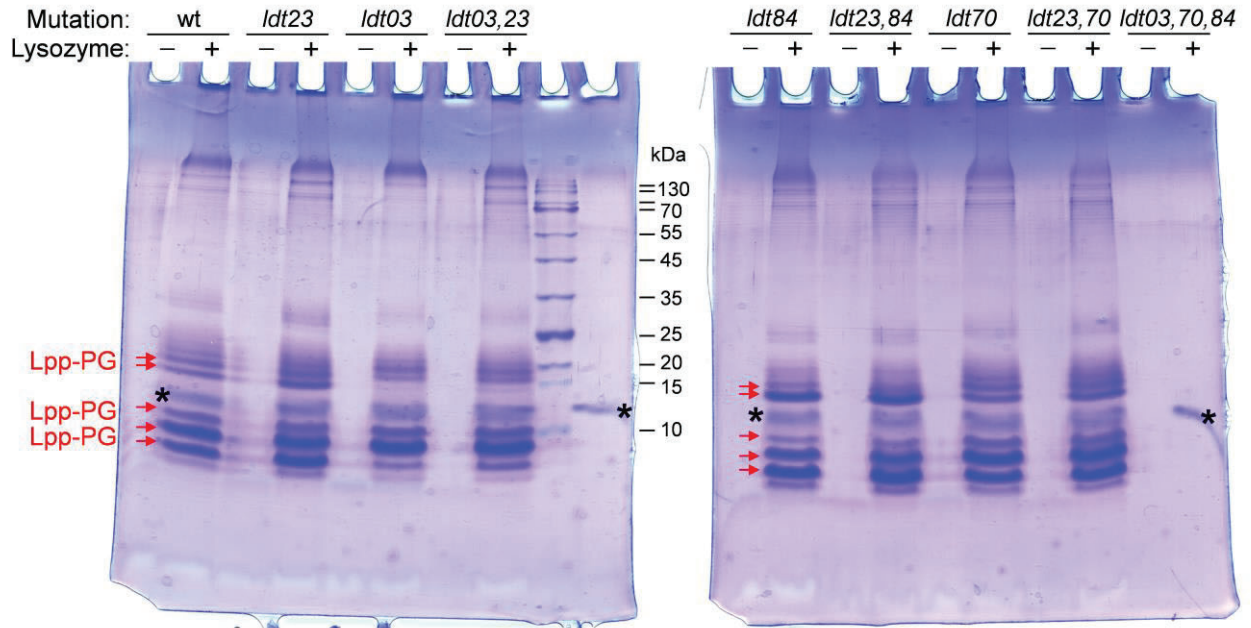
Search for specificity of action of Ldt03 and Ldt84

The patterns of PG-bound forms of Lpp and OutB generated by Ldt03 and Ldt84 differ in some details suggesting a certain specificity of these enzymes towards the PG-bonding site. Indeed, recent xxx studies/analyses of fine PG composition have showed a large variability of composition of stem peptides as well as glycan chains (refs).

On the other hand, it could not be excluded that Ldt03 and Ldt84 could exhibit certain specificity towards the nature of lysine residue to link to stem peptide, namely ultimate vs penultimate. To examine this question, a series of shortened Lpp variants were co-expressed with either Ldt03 or Ldt84 in the *D. dadantii* strain lacking *ldt03*, *ldt84* and *lpp* genes (Fig. Ob). Next description/comparison of data (SDS-PAGE and westerns of PG digested by lysozyme) with Lpp_wt, Lpp_ΔK58 and Lpp_Y57T_ΔK58 to see if there are some obvious differences in the patterns and relative amounts of these Lpp variants depending on if they were linked by Ldt03 or Ldt84.

C-terminal extension of OutB drives attachment of a reporter periplasmic protein to PG.

The C-terminal 6 residue-long Lpp-like box of OutB is preceded with a 22 residue-long region that follows the HR domain (Fig. 1). This region is rich on charged residues and shares some features with sugar-binding motifs (ref). To test the relevance of this region for OutB bonding to PG, a 17 residue-long stretch from G196 to E212 was removed (Fig. 7A). The generated OutB_ΔCt variant remains to be linked to PG although/while apparently less amply as compared to the full-length OutB (Fig. 7B). This suggests a rather limited involvement of this linker region into the bonding of OutB to PG. Otherwise, this could result from a distance matter, i.e. in OutB_ΔCt, the Lpp-like box is located too close to the HR domain causing some spatial hindrance/ interference with the action of implicated Ldt enzymes.



Supplementary figure 3. “*D. dadantii ldt mutants_2*”. PG-bonding patterns of various *ldt* mutant strains of *D. dadantii*. Peptidoglycan from *D. dadantii* wild-type and Δldt mutant strains was digested with lysozyme (+) or undigested (-), separated on SDS-PAGE and stained with Coomassie R250. The Lpp specie bound to PG moieties are indicated with the red arrows and lysozyme with an asterisk.

To further address this question, either the full-length, 30 residue-long C-terminal extension of OutB, or only its short 13 residue-long part carrying the Lpp-like box (as in OutB_ΔCt variant) were fused to the C-terminus of BlaM, a bona fide periplasmic protein (Fig. 7A). PG-bonding tests show that both generated variants, BlaM_CTE and BlaM_ΔCt, were equally linked to the *D. dadantii* PG (Fig. 7C). These data show that six to eight C-terminal residues of OutB constitute a genuine PG-bonding motif that drives linkage of OutB and the reporter periplasmic protein, BlaM, to the *D. dadantii* PG.

The length of the periplasmic linker is important but not crucial for OutB attachment to PG

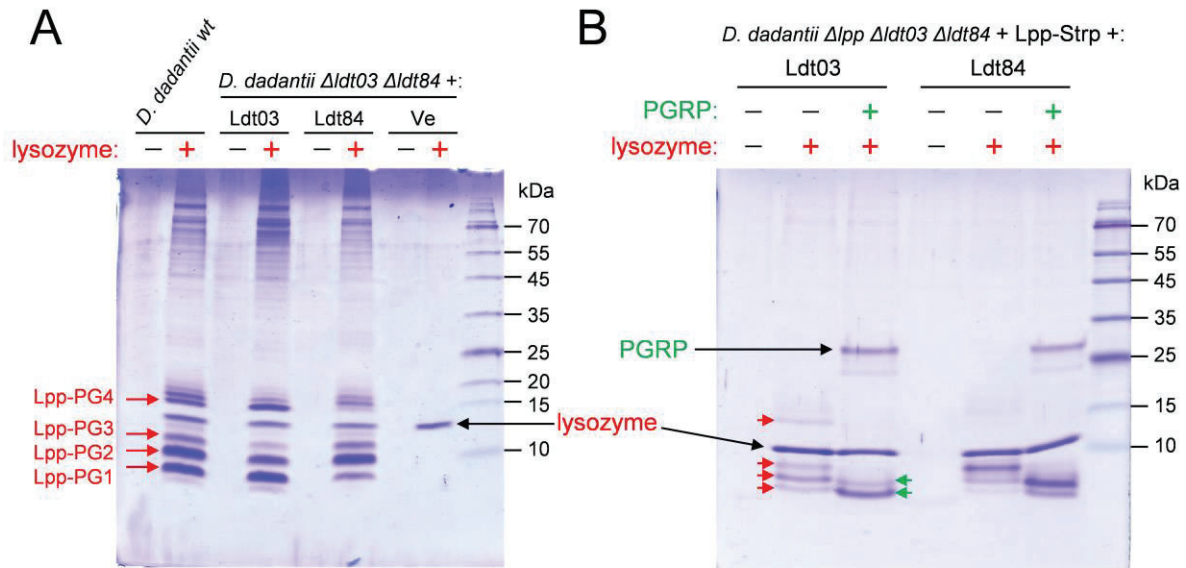
In *E. coli* and other γ -proteobacteria, the trimeric Lpp forms a sort of spring covalently tethering the OM to the PG layer. In this way, Lpp controls the size of the periplasm and mutant Lpp variants with altered lengths cause/impose corresponding variations in the width of the periplasmic space between the OM and PG (Ref). OutB is anchored into the inner membrane via the N terminal hydrophobic helix that is followed by a ~xx residue-long flexible linker and the HR domain interacting with the entry of the secretin pore (Fig. 1A) (0). The Lpp-like box that allows covalent attachment of OutB to PG is located at the C-terminus of the protein. Therefore, by analogy with Lpp, that controls the width of the periplasm, it may be expected that inversely, the length of the linker connecting/between the IM segment and the HR domain of OutB could control the linkage of OutB to the PG because of distance matter.

To test this hypothesis, we constructed OutB variants with altered length of the linker region, OutB_Δ21 and OutB_Δ29 lacking, respectively, 21 or 29 residues and OutB+21 carrying additional 21 residues (Fig. 9A). OutB_Δ21, OutB_Δ29 and OutB+21/All these variants remains to be linked to PG although apparently less amply, as compared to the wild-type OutB (Fig. 9B). These data show that the length of the linker region connecting the HR domain and related Lpp-like motif to the inner membrane is permissive enough. Indeed, the length of this linker region vary even in the close *Dickeya* specie.

In another attempt, we generated a periplasmic variant of OutB, OutB_SP, where the inner membrane segment was substituted with the cleavable signal peptide (Fig. 9A). In contrast to the full-length OutB, no 'free' form of OutB_SP was detected in the intact PG, consistent with the small size of this OutB derivative (19 kDa) that apparently is not retained by (passes through) the meshes of the PG saccules. Yet the digestion of this PG preparation with the lysozyme generated an anti-OutB interacting adduct of an apparent size about 40 kDa (Fig. 9B). The treatment of this PG with the PGRP amidase produced an OutB species of a lower apparent mass consistent with/indicating the removal of glycan moieties. These data show that an inner membrane attachment is not essential for the OutB linkage to PG since the periplasmic OutB_SP variant gains accesses and is covalently linked to the PG.

In the absence of Lpp, OutB is no longer attached to PG

E. coli lpp- mutant bacteria are viable in the laboratory conditions but present multiple defects of the envelope such as formation of blobs and OM vesicles as well as an increased sensitivity to



Supplementary figure 4 “Ldt specificity” Ldt03 and Ldt84 show certain specificity towards the PG sites bound to Lpp. **A.** *D. dadantii* $\Delta ldt03$ $\Delta ldt84$ strain was complemented with a plasmid carrying either *ldt03*, or *ldt84*, or an empty vector. Peptidoglycan from these cultures was extracted, washed, digested with lysozyme, separated on SDS-PAGE and stained with Coomassie G250. The peptidoglycan from the wild type strain carrying both these *ldt* genes was used as a control. Lpp specie linked to PG moieties (Lpp-PG1 to Lpp-PG4) are indicated with arrows. Note the Lpp-PG patterns generated by Ldt03 and Ldt84 differ one from another and from that of the wild-type PG. **B.** Similar experiment was performed with *D. dadantii* Δlpp $\Delta ldt03$ $\Delta ldt84$ strain complemented with a plasmid carrying *lpp-strp* and either *ldt03* or *ldt84*. The peptidoglycan was digested with either lysozyme or PGRP amidase. Note that Lpp-Strp carrying a twin Strep tag (73 residues vs 58 residues in Lpp) behaves as the wild-type Lpp vis-à-vis Ldt03 and Ldt84 generating slightly different digestion patterns.

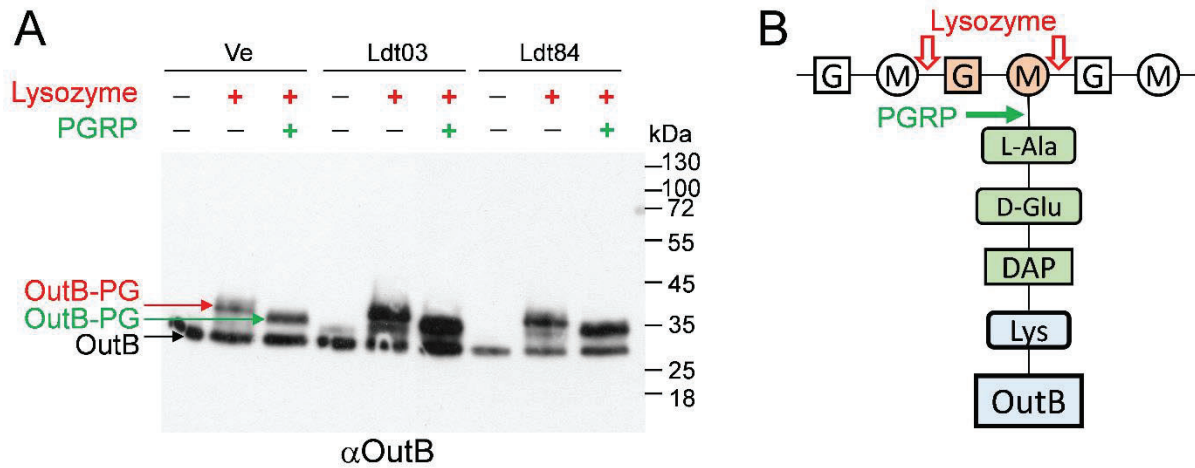
surfactants, antibiotics and some other drugs (Ref). These defects result from an inefficient tethering of the OM to the PG layer. Yet, since OutB interacts with the PG layer from the IM side, it seems possible that OutB could remain to be linked to the PG even in the absence of Lpp. To test this hypothesis, *outB* was expressed in *D. dadantii* Δ *lpp* strain. This mutant strain shows an increased sensitivity to SDS and an ectopic/plasmid expression of the wild-type *lpp* allele restored this defect (Fig. S2A). Rather surprisingly, no PG-bound OutB was detected in the PG sample extracted from the *D. dadantii* Δ *lpp* cells, indicating that OutB could not be covalently linked to the defective cell wall (Fig. S2B). needs a correctly placed PG layer we can speculate is it because of improperly positioned PG layer or the absence of what?

Discussion/Conclusion

We showed that an inner membrane protein, a component of T2SS system is covalently linked to the PG by the same/similar mechanism as Lpp. Difference between OutB and other known proteins covalently linked to PG in Gram-negative bacteria (Lpp and some OMPs): 1. attachment from the IM side; 2. OutB is a moderately expressed protein and it does not play a structural role towards the cell envelope, but scaffolding role for the related T2SS.

The PG-bonding Lpp-like motif of OutB is grafted/attached onto the periplasmic HR domain, which in turn is linked to the IM anchor with/via an extensive flexible linker. The length of this linker vary substantially even among/in the close *Dickeya* species/strains. Consistent with this observation, we showed that truncation or lengthening of this linker did not prevent the OutB linking to PG, yet slightly diminished its efficiency. It seems therefore likely that the OutB periplasmic linker is naturally extensible and flexible and hence, permissive for additional shortening or enlargements. In this way, OutB linker is better adapted to both roles: i) get close the HR domain to the N0 domain of secretin and ii) draw the Lpp-like motif close to the PG layer. Supporting this vision/Consistent with these suggestions, in the Alfold model of OutB, this linker takes a rather disordered form/shape allowing/consistent with a large flexibility.

Interestingly, TolR, a protein from transenvelope Tol-Pal complex, shares a similar cell and domain topology with OutB (12). TolR is anchored into the IM via an N-terminal membrane helix and carries an OmpA-like periplasmic PG-binding domain, which is linked to the IM by an extensible linker (Ref). Yet, in TolR, this linker is substantially shorter, 25 residues versus ~60 residues in OutB. In the resting state, the PG-binding domain of TolR is located close to the IM. However, an energy (PMF)-driven conformational changes in Tol-Pal complex trigger extension of the TolR linker and allows the related PG-binding domain to reach and bind the PG layer (JBC15). It seems therefore likely that the length of the OutB linker is largely enough to fulfill a roughly similar function, connect an IM anchor with the PG-binding domain. An apparently excessive length of OutB linker is probably due to the role of OutB as scaffolding protein for the secretin pore. Since the HR domain of OutB interacts tightly with the entry of the mega Dalton-sized 15-meric secretin channel that is largely protruded into the periplasm. A long and extendable linker could allow for an easy contact between OutB HR and OutD N0.



Supplementary figure 5 “Ldt specificity on OutB”. The L,D-transpeptidases Ldt03 and Ldt84 are required for the covalent attachment of OutB to PG. **A.** Ectopic expression of *ldt03* and *ldt84* reinforces covalent attachment of OutB to PG. Peptidoglycan from *D. dadantii* wild-type strain carrying pGMT-OB and pBAD33 plasmid, either empty (Ve) or with *ldt03* or *ldt84* was digested or not with lysozyme or PGRP amidase and analyzed by Western blot with anti-OutB antibodies. The positions of OutB and OutB-PG derivatives linked to PG moieties generated by the lysozyme and the PGRP amidase are indicated with red and green arrows, respectively. **B.** Schematic of action of the lysozyme and the PGRP amidase on OutB bound to PG.

We found that the sequence of Lpp-like box is variable enough and permits/tolerates some substantial residue substitutions. For instance, OutB and Lpp_Dd lacking the last C-terminal 'enzymatic' lysine could be/are linked to stem peptide through the penultimate lysine. It is not the case for *E. coli*-like Lpp that are ended by an Arg-Lys sequence. We showed that The arginine guanidinium group is not able to form a covalent bond with the carboxyl group of mDAP. The actual occurrence and biological relevance of such a bonding via the penultimate lysine in Lpp_Dd and OutB remain to be established. It is possible/could not be excluded that Lpp_Δ58K variant of *D. dadantii* mimics the Lpp motifs from *Photobacterium*, *Zobellella* and *Vibrio* that are naturally ended by an S/RGTK sequence. (From this point of view it would be interesting to test LppΔ58K variant that is ended by VRYTK; a priori, it should be better linked to PG that VRTYK (tested) and VRTTK (in construction). Next, if any specificity/preference of action of Ldt03 or Ldt84 towards this penultimate lysine would be found (by western and/or MS), this could be discussed more largely. Also, dependent on success with MS data, we could find or not somewhat reminiscent to mDAP-K57 bonded peptide even in the context of wild-type Lpp. Next, also related to this point, in the Lpp alignment figure from FEMS Collet review, about one half of Lpp are ended by RK and another half by KK. First, if we build Lpp phylogenetic tree, are RK and KK grouped or dispatched between the different clads? More probably, dispatched. We could build another tree basing on the last 18 residues of Lpp homologs to compel more clear appearance of RK and KK groups. Next, depending on western/MS data on putative specificity of Ldt03 and Ldt84 towards penultimate Lys, we can build phylogenetic tree for Ldt from the same representatives as for Lpp tree to see if there are any co-occurrence/co-evolution of KK and Ldt, better 'specialized' for KK ending.

In any case, to say/discuss somewhat about specificity of action of *D. dadantii* Ldt, mainly dependent on the MS data? We can also build a simplified Ldt tree for bacteria carrying an Lpp ortholog and analyze synteny of these genes and its conservation or not.

The facts that Lpp-like box/motif of OutB drives PG-bonding of a reporter periplasmic protein BlaM and that the sequence of Lpp box that allows the PG-bonding is variable enough, it is tempting to speculate that some other periplasmic and/or membrane proteins exposed in the periplasm could also be covalently linked to PG like OutB. Such putative proteins may be difficult to identify by 'classical' MS approach because of their low/moderate expression level; the background noise generated by highly abundant Lpp and OMPs could prevent their identification. On the other hand, in the absence of correct assembly and tethering of the PG layer by Lpp (in Δlpp strain), the PG-covalent linkage of such putative proteins would be such as is the case for OutB.

Discussion

Les travaux présentés dans cette thèse ont pour but de déchiffrer les mécanismes moléculaires de l'attachement covalent d'un composant du T2SS, OutB, au PG chez la γ -protéobactérie *D. dadantii*. Une étude précédente a démontré que l'extension C-terminale (CTE) d'OutB interagissait avec le PG (Zhang *et al.* 2022). L'inspection détaillée de la CTE d'OutB a révélé que sa séquence C-terminale (VRTTKK) était similaire à celle de Lpp de *D. dadantii* (VRTYKK). Le couplage de Lpp s'effectue par le groupe ϵ -amine de sa lysine C-terminale au groupe α -carboxyle du mDAP³ d'un tripeptide-tige (Braun 1975; Magnet *et al.* 2007). Lors de cette étude, nous avons montré que la protéine OutB était liée au PG par un mécanisme similaire à celui de Lpp. Plus précisément, les deux lysines C-terminales d'OutB semblent être impliquées dans son attachement au PG. La recherche des enzymes responsables de ce couplage a révélé que deux L,D-transpeptidases de *D. dadantii*, Ldt03 et Ldt84, effectuent l'attachement covalent d'OutB et de Lpp au PG. Par ailleurs, les études précédentes ont démontré que chez *E. coli*, trois transpeptidases sont responsables de l'attachement de Lpp au PG : LdtA (ErfK), LdtB (YbiS) et LdtC (YcfS) (Magnet *et al.* 2007). Nous avons montré que Ldt03 était phylogénétiquement proche de LdtA et LdtB, tandis que Ldt84 était plus proche de LdtC. L'expression hétérologue des LdtA, LdtB et LdtC d'*E. coli* chez *D. dadantii* a révélé que celles-ci étaient actives vis-à-vis de la Lpp de *D. dadantii*. Plus précisément, l'action de LdtA et LdtB génère des profils de Lpp-PG similaires à ceux de Ldt84 et Ldt03, respectivement. En effet, nous avons pu constater une différence de profils de formes de Lpp attachées au PG, générées par les L,D-transpeptidases de *D. dadantii* et celles d'*E. coli*. Cela suggère que chacune de ces quatre Ldt posséderait une certaine spécificité enzymatique envers la zone de couplage au PG. Effectivement, l'analyse du PG par spectrométrie de masse réalisée par l'équipe de Michel ARTHUR a démontré que la Ldt03 réalisait le couplage de Lpp presque exclusivement sur un peptide-tige monomérique (3 \rightarrow Lpp), tandis que Ldt84 effectuerait le couplage de Lpp en préférence sur des peptides-tige dimériques liés par une liaison (4 \rightarrow 3 \rightarrow Lpp ou 3 \rightarrow 4-3 \rightarrow Lpp).

L'étude des protéines attachées au PG chez les protéobactéries a été initiée par la découverte du couplage covalent de Lpp au PG chez *E. coli* (Braun et Rehn 1969). En 2020, deux études publiées simultanément ont reporté le couplage de protéines de la membrane externe (OMP) en tonneau- β chez certaines protéobactéries dépourvues de Lpp (Godessart *et al.* 2021; Sandoz *et al.* 2021). Ces protéines sont attachées au PG par l'amine N-terminale d'un résidu alanine ou glycine N-terminale (Godessart *et al.* 2021; Sandoz *et al.* 2021), à la différence de Lpp, qui est attachée par le groupe ϵ -amine de la chaîne latérale de la lysine C-terminale (Magnet *et al.* 2007). Sandoz et ses collègues ont également reporté que la lipoprotéine LimB de la γ -protéobactérie *C. burnetii* était attachée de manière covalente par le groupement ϵ -amine de la chaîne latérale d'une lysine située à l'intérieur de la séquence de LimB (Sandoz *et al.* 2021). Nos résultats illustrent un tout autre exemple, le couplage de la protéine située dans la MI, OutB. Contrairement à Lpp et aux OMPs en tonneau- β , qui sont des protéines très abondantes et agissent comme ancrage de la membrane externe au PG, OutB est exprimée modérément et utilise le PG comme une matrice pour son propre attachement, et pour l'attachement du système Out à l'enveloppe bactérienne.

Afin de déchiffrer le mécanisme moléculaire de ce phénomène, une série de mutagenèses dirigées de la région C-terminale d'OutB et de Lpp a été réalisée. Curieusement, à notre connaissance, à part une étude pionnière (Zhang et Wu 1992), aucune mutagenèse systématique de Lpp n'a été rapportée. A l'inverse de Lpp, il s'est avéré qu'OutB peut être couplée au PG par sa lysine C-terminale, indépendamment de la présence de la charge positive du pénultième résidu. En effet, la version d'OutB ne possédant qu'une seule lysine C-terminale (VRTTK) était aussi bien attachée au PG qu'OutB sauvage (VRTTKK). En revanche, en accord avec le rôle central des résidus lysines, la délétion des deux lysines C-terminales (VRTT) a aboli le couplage d'OutB au PG. Le couplage de Lpp d'*E. coli* nécessite la présence d'un acide aminé chargé positivement en pénultième position (ATKYRK), puisque la substitution de l'avant-dernière arginine par des acides aminés non chargés (Asp ou Leu) a aboli la liaison de Lpp au PG (Zhang et Wu 1992). Or, dans cette étude, il n'a pas été testé de substitution Arg57Thr ou Arg57Ser, laquelle pourrait être plus permissive. Chez Lpp de *D. dadantii* (VRTYKK), nous avons observé que la délétion de la lysine C-terminale de Lpp avait fortement diminué son couplage au PG (Fig 40.C), malgré la présence d'une seule lysine, confirmant le rôle important de deux charges positives en C-terminal pour le couplage de Lpp au PG. Les expériences de mutagenèse dirigée ont montré que la substitution de l'avant dernière lysine C-terminale par une arginine (KK→ RK) conservait le couplage covalent de Lpp de *D. dadantii* au PG. Curieusement, nous avons également montré qu'une faible quantité du variant de Lpp possédant une arginine C-terminale et une substitution de la tyrosine 57 par la thréonine (Lpp_Δ58-Y56T-K57R) était attachée au PG (Fig. 40.C). En revanche, cette forme de Lpp ne permet pas de rétablir la résistance au SDS et n'est donc pas fonctionnellement active. Vu la différence notable entre la chaîne latérale de la lysine et le groupe guanidinium de l'arginine, la chimie d'un tel couplage reste à confirmer.

Par ailleurs, tout comme OutB, certaines Lpp comme celles de *Vibrio cholerae*, *Photobacterium damsela*, *Zobellella denitrificans* possèdent une extrémité C-terminale (YTK) dépourvue d'un deuxième résidu chargé positivement (Asmar et Collet 2018). De même, LppB de *Salmonella enterica*, non exprimée dans les conditions de laboratoire, possède également ce type d'extrémité C-terminale (ICK) (Kröger *et al.* 2013). En revanche, aucune étude ne s'est intéressée particulièrement à l'attachement de ces variants de Lpp au PG chez leur bactérie respective. Il n'est pas exclu que les conditions de couplage des protéines au PG chez ces bactéries soient différentes de celles d'*E. coli*. De même, on peut souligner qu'il n'existe pas de résidu chargé positivement à proximité de la lysine intrachaine de la lipoprotéine LimB, couplée au PG (Sandoz *et al.* 2021). On peut également noter qu'à l'inverse de Lpp, le couplage des OMPs en tonneau-β est conditionné à la présence d'un résidu aspartate chargé négativement après les résidus alanine ou glycine couplés en N-terminal (Godessart *et al.* 2021; Sandoz *et al.* 2021). Nos résultats apporteraient donc une preuve supplémentaire suggérant que chaque protéine possède ses propres conditions de couplage au PG. Ainsi, l'état des connaissances actuelles ne permettrait pas de prédire *a priori* le couplage d'une protéine, et à plus forte raison, de prédire quel résidu de la protéine serait couplé au PG chez les γ-protéobactéries. Ces conditions de couplages pourraient découler de la structure secondaire ou tertiaire de la protéine. Néanmoins, il n'est pas exclu que les résidus environnant la lysine couplée jouent un rôle prépondérant dans sa reconnaissance du résidu en tant que substrat. Les conditions permettant de prédire le couplage de protéines au PG restent donc encore à découvrir.

La substitution de la thréonine antépénultième d'OutB par une tyrosine n'a que faiblement augmenté le taux de couplage d'OutB au PG chez *D. dadantii*. En revanche, lorsque la CTE d'OutB est fusionnée à BlaM, le variant BlaM_CTE_T218Y est plus efficacement couplé que la fusion « sauvage » (Fig. 34.C). A l'inverse, la substitution de la tyrosine par une thréonine chez Lpp de *D. dadantii* a drastiquement diminué son couplage au PG (Fig 40.C). Curieusement, la souche exprimant ce variant de Lpp se comportait comme la souche sauvage lors des tests de résistance au SDS, indiquant que ce variant permettait la stabilisation de l'enveloppe de *D. dadantii*, sans être massivement couplée covalamment au PG. L'antépénultième tyrosine de Lpp est conservée chez de nombreuses espèces, excepté chez *A. baumannii* et *P. aeruginosa*, chez lesquelles Lpp possède une sérine à la place de la tyrosine (SRK) (Asmar et Collet 2018). On peut noter que les résidus sérine, thréonine et tyrosine possèdent un groupement hydroxyle, qui pourrait jouer un rôle lors du couplage. Or, il a été montré que le cycle aromatique de la tyrosine permettait de stabiliser l'extrémité C-terminale de trois hélices de Lpp, et que la tyrosine jouait donc un rôle important dans le maintien de sa structure (Shu *et al.* 2000). Par ailleurs, la conservation de la structure de Lpp en triple hélice doit être primordiale pour sa fonction. La substitution des 30 résidus C-terminaux de Lpp par une séquence d'une longueur équivalente issue de la CTE d'OutB n'a pas permis de générer une fusion stable préservant la structure en triple hélice α , puisque la CTE d'OutB ne semble pas adopter cette structure secondaire. Il est donc bien probable que les fusions Lpp:OutB construites n'étaient pas stables, et donc n'ont pas pu être massivement couplées au PG. Bien que ces raisons semblent assez évidentes, il nous a paru intéressant de tester ce type de fusions. En revanche, dans le cas de la fusion BlaM-CTE, la CTE a été fusionnée à un domaine protéique bien compact et stable, ce qui a permis le couplage de la fusion Bla-CTE au PG (Fig. 34). Ainsi, ce type de contraintes structurales peut conditionner également le couplage des autres protéines au PG.

Nous avons ensuite testé le rôle du linker d'OutB, en tentant notamment de déterminer l'impact de sa longueur sur la facilité d'accès de la CTE au PG. La Lpp-box d'OutB est rattaché au domaine HR périplasmique, lui-même relié au segment transmembranaire via une longue région linker, dont la taille varie au sein même du genre *Dickeya* et des bactéries proches (Zhang *et al.* 2022). Nos résultats ont montré que le raccourcissement du domaine linker d'OutB de 29 ou 22 résidus, ou l'allongement de 21 résidus permettait toujours le couplage d'OutB au PG. Ainsi, la longueur de la région linker d'OutB est assez permissive et pourrait en même temps faciliter le positionnement du domaine HR vis-à-vis du domaine N0 de la sécrétine, et faciliter l'accès de la CTE d'OutB proche de la couche de PG. En accord avec cette hypothèse, la région linker du modèle Alphafold d'OutB présente une structure flexible. Les analyses de cellules de γ -protéobactéries en microscopie électronique ont suggéré que la couche de PG serait située à 18 nm de la membrane externe (ce qui correspond à la taille de la sécrétine), et à 7 nm de la MI (Cohen *et al.* 2017). Or, une étude récente a montré que dans les conditions hyperosmotiques, ces distances varient et que la ME serait située à 8 nm du PG, lui-même situé à 18 nm de la MI en moyenne (Mandela *et al.* 2022). Ainsi, il est possible que pour ces raisons, OutB possède une longue région linker pour ne pas être soumise à des contraintes de taille trop importantes pour son couplage au PG, tout en étant à proximité du T2SS. De plus, nos travaux ont montré que le variant périplasmique d'OutB (OutB_PS) dépourvu d'ancrage à la MI était couplé au PG. Ceci signifie que la région linker et le segment transmembranaire ne sont pas des éléments nécessaires

per se au couplage au PG. Par ailleurs, il a été montré que l'expression de la version OutB_PS permettait l'adressage correct de la sécrétine OutD à la ME, indiquant que le segment transmembranaire d'OutB n'était pas non plus indispensable à l'adressage de la sécrétine (Zhang *et al.* 2022). Il n'est pas exclu que le couplage covalent d'OutB_PS au PG lui permette de maintenir une position stable dans le périplasme, et ainsi, de remplir sa fonction de protéine d'échafaudage vis-à-vis de la sécrétine OutD. Une expérience ultérieure pourrait donc tester l'adressage d'OutD à la ME lors de l'expression d'une version d'OutB_PS délétée des lysines C-terminales (OutB_PS_K219tga). Si le couplage de la protéine au PG est important, alors OutB_PS_K219tga ne permettra pas la mise en place d'OutD et la sécrétion de pectinases serait affectée.

Toutes les protéines couplées au PG découvertes jusqu'alors (Lpp, LimB et les OMP en tonneau- β) étaient des protéines de la ME responsables de la stabilisation de l'enveloppe bactérienne. Or, naturellement, OutB n'est pas impliquée dans la stabilité de l'enveloppe, mais joue un rôle dans la mise en place de la sécrétine OutD du T2SS de *D. dadantii* (Zhang *et al.* 2022). La surexpression d'OutB seule ou sa co-expression avec une Ldt, n'augmente que faiblement la quantité de la protéine couplée au PG. Ceci suggère que la topologie cellulaire d'OutB ou l'exposition de sa CTE vis-à-vis de la couche de PG ne sont pas bien adaptées à un rôle structurant dans l'enveloppe. Les domaines de liaison non covalents au PG permettent de stabiliser les complexes multiprotéiques à travers l'enveloppe, tels que les systèmes de sécrétion, les pili et les flagelles. Par exemple, il a été montré que la protéine Sciz ancrant le T6SS au PG chez *E. coli* (Aschtgen, Gavioli, *et al.* 2010). La sécrétine PilQ du T4P de *Myxococcus xanthus*, possède trois domaines AMIN N-terminaux de liaison non covalente au PG (Ghosal *et al.* 2019). Plus proche de notre cas, un mécanisme similaire est observé chez *Legionella pneumophila*, où la stabilisation du T2SS est directement assurée par la sécrétine elle-même. En effet, celle-ci possède un domaine N-terminal de liaison non covalent au PG, SPOR, lui permettant de se fixer sur les zones particulières de PG et se localiser au pôles de la bactéries (Ghosal *et al.* 2019). Chez *Dickeya* et certaines autres bactéries, OutB stabilise le canal de la sécrétine en interagissant avec son domaine N-terminal, N0, via le domaine HR, servant ainsi d'échafaudage entre la membrane interne et le PG auxquels OutB est attachée. Chez *Aeromonas hydrophila*, les protéines GspA/GspB seraient responsables du recrutement du T2SS en se liant et en modifiant localement le PG, puis en assistant la mise en place de la sécrétine (Vanderlinde *et al.* 2017). La protéine OutB, ou plus généralement GspB, est un composant du T2SS dit 'accessoire', puisqu'il n'est pas conservé chez tous les T2SS, et son organisation en domaines varie selon les groupes de bactéries (Zhang *et Wu* 1992). Curieusement, la Lpp-box n'est présent que chez *D. dadantii* et quelques autres espèces proches dans le genre *Dickeya*, mais pas chez les espèces plus éloignées phylogénétiquement, comme *D. lacustris* et *D. aquatica*. Les protéines GspB des genres bactériens apparentés, comme *Pectobacterium* ou *Klebsiella* en sont également dépourvues et possèdent une CTE plus courte (Zhang *et Wu* 1992). Il semble donc qu'une CTE de type *D. dadantii* avec une Lpp-box est une invention évolutive assez récente. De manière générale, les modules de liaison au PG (PGBD) représentent une partie moins conservée des systèmes de sécrétion et de transport. Par exemple, une analyse *in silico* des systèmes de sécrétion de type VI a démontré une forte variabilité de leurs PGBD (Aschtgen, Gavioli, *et al.* 2010). Les auteurs ont suggéré que les PGBD ont évolué et se sont diversifiés plus récemment, en fonction du contexte particulier de la paroi cellulaire. Une étude précédente a montré qu'OutB jouait un rôle important dans la virulence

de *D. dadantii*, puisque le mutant *outB* ne provoque pas d'infection *in planta* (Zhang et Wu 1992). La même étude a montré que la délétion de la CTE diminuait faiblement la sécrétion de pectinases, ce qui suggère que l'attachement covalent d'OutB joue un certain rôle positif dans le fonctionnement ou la mise en place du T2SS chez *D. dadantii*. Ainsi, la Lpp-box d'OutB de *D. dadantii* pourrait permettre l'assemblage plus efficace du T2SS, et pourrait expliquer les raisons évolutives de l'apparition de ce motif protéique ressemblant à l'extrémité C-terminale de Lpp.

Cette étude nous a permis d'identifier les L,D-transpeptidases impliquées dans le couplage covalent de Lpp et d'OutB chez *D. dadantii*. Les études précédentes réalisées chez *E. coli* ont montré que les Ldts n'étaient pas indispensables à la survie de la bactérie car la souche mutante dépourvue de 5 gènes *ldt* est viable en condition de laboratoire (Magnet *et al.* 2008; Magnet *et al.* 2007). De même, chez *D. dadantii*, la délétion des 4 gènes de *ldts* identifiés n'a causé aucun défaut majeur de croissance bactérienne dans un milieu riche. La comparaison de la séquence des Ldts de *D. dadantii* et celles d'*E. coli* a suggéré que la Ldt523 de *D. dadantii* serait un orthologue de l'endopeptidase LdtF ou DpaA (YafK) d'*E. coli* (Bahadur *et al.* 2021; Winkle *et al.* 2021). Ldt70 serait l'homologue de LdtD (YcbB) d'*E. coli*, laissant supposer que Ldt70 serait responsable de la réticulation (3→3) du PG en condition de stress (Hugonnet *et al.* 2016). Curieusement, *D. dadantii* ne possède pas d'homologue proche de LdtE (YnhG), la Ldt de ménage chez *E. coli* (Magnet *et al.* 2008). De futures investigations pourraient déterminer si chez *D. dadantii*, le rôle de LdtE est également effectué par Ldt70. Or, il est aussi probable que les modes de vie différents de ces bactéries ou des niches écologiques qu'elles s'occupent conditionnent certaines modifications de leur PG respectif. En revanche, *D. dadantii* possède deux Ldts impliquées dans le couplage de Lpp et d'OutB au PG : Ldt03 et Ldt84. Ldt03 posséderait une plus grande similarité avec LdtA (ErfK) et LdtB (YbiS), tandis que Ldt84 serait plus proche de LdtC (YcfS). Curieusement, le gène *ldt84* partage les mêmes gènes voisins avec *ldtE* d'*E. coli*, plus précisément, *ldt84* comme *ldtE* sont colocalisés avec le gène *lpp*. Par ailleurs, même si LdtE effectue le couplage de peptides-tiges, elle possède une plus grande similarité avec les Ldts effectuant le couplage de Lpp au PG, mais pas avec LdtD. On pourrait donc suggérer que la spécialisation de LdtE envers le couplage de peptides-tiges soit une évolution récente chez *E. coli* à partir des gènes de Ldt réalisant le couplage de Lpp au PG. Evidemment, l'examen d'une telle hypothèse nécessite des études phylogénétiques et enzymatiques chez une cohorte bien représentative de protéobactéries.

Nos travaux ont suggéré que Ldt03 et Ldt84 de *D. dadantii*, ainsi que LdtA et LdtB d'*E. coli* posséderaient chacune une spécificité enzymatique. Cette hypothèse était fréquemment évoquée dans la littérature, sans jamais être démontrée. Plus récemment, l'analyse du PG des mutants *ldt03* et *ldt84* réalisée par nos collaborateurs de l'équipe de M. Arthur a suggéré que Ldt03 serait plus active pour former de liaison covalente entre Lpp et un monomère de muropeptide (3→Lpp). En revanche, Ldt84 serait plus active sur un dimère de muropeptide (4→3→Lpp ou 3→4-3→Lpp). Ces résultats suggèreraient l'existence d'une coopération entre les Ldts et les PBPs pour le couplage de Lpp. Les associations d'activité enzymatique complémentaires entre les Ldts et les PBPs ont déjà été reportées dans la littérature concernant la réticulation du PG. Par exemple, lors de l'inhibition de l'activité D,D-transpeptidase de PBPs par les β-lactames, l'activité L,D-transpeptidase de LdtD (YcbB) nécessite l'activité glycosyltransférase de PBP1b et l'activité D,D-carboxypeptidase de PBP5 (DacA) (Hugonnet *et al.* 2016). Ainsi, il est possible qu'un partenariat PBP/Ldt puisse également être mis en place pour le

couplage de Lpp par Ldt84. On peut imaginer que Ldt84 agisse en synergie avec les PBP1a/1b/1c ou PBP2 et PBP3 pour la formation de liaisons ($4 \rightarrow 3 \rightarrow \text{Lpp}$). Il n'est pas non plus exclu que l'action de Ldt et de PBP soit simultanée, ou bien au contraire, qu'elle soit constituée de deux phases temporellement distinctes. Une telle hypothèse pourrait expliquer en partie que l'expression de Ldt84 en présence d'ampicilline, β -lactamine inhibant les PBPs, provoque un effet toxique ou bactériostatique chez le mutant *ldt03/ldt84* de *D. dadantii*. Il est possible que l'inactivation de l'activité D,D-transpeptidase de PBP nuirait au couplage effectué par Ldt84, du fait de l'absence de la formation de son substrat ($4 \rightarrow 3$). Par ailleurs, la similarité apparente des profils de Lpp générés par Ldt84 de *D. dadantii* et LdtA d'*E. coli*, suggère que cette dernière serait également responsable du couplage de Lpp à un dimère de peptides-tige. On peut également imaginer que Lpp soit liée à des tripeptides dimérisés ($3 \rightarrow 3 \rightarrow \text{Lpp}$). Un tel substrat impliquerait un partenariat entre deux Ldts, Ldt84 et Ldt70. Si cette hypothèse s'avère exacte, le nombre de substrats ($3 \rightarrow 3 \rightarrow \text{Lpp}$) présents dans le PG serait très limité, puisque les couplages ($3 \rightarrow 3$) représentent seulement 7 % des couplages totaux du PG en phase exponentielle de croissance chez *E. coli*, contre 93 % de couplages ($4 \rightarrow 3$) (Höltje 1998; Magnet *et al.* 2008).

Nos résultats ont montré que la complémentation du mutant *ldt03/ldt84* avec LdtC restaurait très faiblement la résistance au SDS, et présentait une quantité assez faible de Lpp couplée au PG. Les profils de Lpp-PG générés par LdtC suggèrent que cette enzyme effectue de préférence le couplage de Lpp à des peptides-tiges monomériques, comme Ldt03 et LdtB. Ces résultats pourraient également être en lien avec le taux d'expression des Ldts chez *E. coli*. Les substrats Tétra-Tri sont présents en abondance chez *E. coli* (Magnet *et al.* 2008), en ce sens la Ldt qui utilise ce substrat pour le couplage de Lpp devrait elle-même être majoritairement présente, comme c'est le cas de LdtB (5000 copies par cellules chez *E. coli*) (Li *et al.* 2014), ce qui est cohérent avec nos résultats, qui montrent que LdtB serait plus active sur le couplage de Lpp aux peptides-tiges monomériques. En revanche, LdtC ne semblait pas responsable d'un nombre très important de formes de Lpp au PG chez *D. dadantii*, malgré son expression sur plasmide (Fig. 46.A), ce qui serait cohérent avec son taux d'expression chromosomique de 500 copies par cellules chez *E. coli* (Li *et al.* 2014). Néanmoins, cela ne permet pas d'expliquer pourquoi LdtA, qui serait responsable du couplage de Lpp au peptide-tiges dimériques, pourtant majoritaires, est exprimée au taux le plus faible, de 70 copies par cellule (Li *et al.* 2014). Il est donc bien possible que les niveaux d'expression de gènes *ldt*, obtenus dans un milieu synthétique ne reflètent pas l'importance de ces enzymes dans les conditions réelles de la vie de la bactérie. De plus, il convient de noter que les profils de Lpp obtenus ne sont pas en lien direct avec le niveau d'expression réel de ces Ldt chez *E. coli*, puisque les gènes *ldt* d'*E. coli* ont été exprimés sur le plasmide pGEM-T à fort nombre de copies.

Par ailleurs, nos expériences ont montré que le taux de sécrétion de pectinases était significativement réduit chez le mutant *lpp* et le mutant *ldt03/ldt84*, chez lequel Lpp n'est plus couplé de façon covalente au PG. Ces résultats démontrent encore une fois l'implication de Lpp dans de nombreux processus biologiques tels que la résistance aux stress et la virulence.

Chez *E. coli*, Lpp est responsable du maintien de la taille du périplasme, et serait en particulier responsable de l'espacement entre la ME et le PG (Asmar *et al.* 2017; Cohen *et al.* 2017). Plus récemment, une étude a suggéré que la couche de PG compensait l'allongement de Lpp de 21 résidus

en repoussant le PG vers la MI (Mandela *et al.* 2022). Dans ce contexte, nous avons voulu savoir si des versions d'OutB raccourcies ou allongées d'une vingtaine de résidus étaient capables de se coupler au PG, en présence de Lpp de taille différente. Comme première approche, les versions raccourcies et allongées d'OutB et de Lpp ont été exprimées simultanément à partir de plasmides. Or, il est apparu impossible dans ces conditions d'assurer une production stable des deux protéines. Nous n'avons donc pas pu évaluer la capacité d'OutB à se lier au PG dans un contexte de Lpp d'une longueur variable. Nous avons néanmoins pu observer que le mutant *lpp* de *D. dadantii* exprimant une version courte de Lpp (Lpp Δ 21) formait des colonies muqueuses et que le mutant exprimant *lpp+21* formait des colonies sèches. Une étude récente a montré que le senseur de stress RcsF à la ME ne pouvait plus interagir avec son interactant IgaA à la MI lors de l'allongement de Lpp de 21 résidus, ce qui empêchait l'activation de la réponse Cpx (Hussein *et al.* 2018). Dans notre cas, il est possible qu'à l'inverse, le raccourcissement de Lpp induise l'activation constitutive de senseur de stress RcsF, mais que l'allongement de Lpp empêche une telle réponse de s'établir. En effet, l'activation de la voie Rcs (Regulation of Capsule Synthesis) provoque une surproduction d'exopolysaccharides et la formation des colonies muqueuses. En accord avec cette hypothèse, les résultats de tests de résistance au SDS montrent que la souche exprimant Lpp Δ 21 est plus résistante au SDS que la souche exprimant Lpp+21. Il est possible que la production d'exopolysaccharides par la souche exprimant Lpp Δ 21 (muqueuse) lui confère une plus grande résistance au SDS. Par ailleurs, il a été montré par AFM que chez la souche d'*E. coli* exprimant Lpp+21, la ME est plus souple que celle exprimant Lpp wt (Mathélié-Guinlet *et al.* 2020). De plus, l'expression de *lpp+21* engendrerait la vésiculation de la ME, confirmant la déstabilisation de celle-ci chez ce variant.

L'attachement covalent de Lpp au PG permet l'ancrage de la ME au PG. En absence de Lpp, ou en présence de Lpp dépourvue de sa lysine C-terminale, la membrane externe n'est plus attachée au PG. En conséquence, la ME est déstabilisée et forme des vésicules extracellulaires (Mathélié-Guinlet *et al.* 2020; Sonntag *et al.* 1978). Lors de l'observation de l'enveloppe des mutants *lpp* de *D. dadantii* en microscopie, nous avons remarqué que la ME formait des vésicules extracellulaires, ce qui est en accord avec les observations réalisées chez *E. coli* (Asmar *et al.* 2017; Mathélié-Guinlet *et al.* 2020; Sheng *et al.* 2023). De plus, les tests de sensibilité au SDS que nous avons réalisés ont montré que ces souches étaient plus sensibles au SDS que la souche sauvage de *D. dadantii*. Encore une fois, ces résultats sont en accord avec les études précédemment publiées chez *E. coli* (Mathélié-Guinlet *et al.* 2020). Nous avons également testé la sensibilité au SDS du double mutant *ldt03/ldt84* chez lequel Lpp n'est plus couplée au PG. En accord avec cette hypothèse, le mutant *ldt03/ldt84* présente une sensibilité accrue au SDS, mais qui est néanmoins plus faible (sa résistance au SDS est donc plus forte) que chez le mutant dépourvu de *lpp* (Fig. 43). Cependant, l'analyse de PG issue de la souche *ldt03/ldt84* montre qu'aucune forme de Lpp n'est liée de façon covalente au PG (Fig. 44.A) ce qui suggère que même Lpp non-couplée au PG confère un certain niveau de stabilité à l'enveloppe bactérienne. Curieusement, l'observation de l'enveloppe de *D. dadantii* en microscopie a révélé que le double mutant *ldt03/ldt84* ne présentait pas de vésicules extracellulaires se détachant de la ME, bien que nous ayons montré que Lpp n'était pas couplée de manière covalente chez ce mutant. Ces résultats en microscopie sont cohérents avec les tests de sensibilité au SDS évoqués plus haut et indiquent que même en absence du couplage covalent de Lpp par les Ldt, l'enveloppe préserve un certain niveau

d'intégrité. Généralement, la suppression du couplage covalent des protéines impliquées dans la stabilité du PG induit la vésiculation de la ME. C'est le cas avec la délétion de la lysine C-terminale de Lpp chez *E. coli* (Mathélié-Guinlet *et al.* 2020), mais également avec les OMPs en tonneau- β responsables de l'attachement de la ME au PG chez certaines protéobactéries (Godessart *et al.* 2021). Néanmoins, nos observations suggèrent que même en absence du couplage covalent, Lpp pourrait se lier de façon non covalente au PG ce qui permet de stabiliser partiellement l'enveloppe du mutant *ldt03/ldt84*. L'analyse du surnageant de la culture d'*E. coli* délété des Ldts responsables du couplage de Lpp (*ldtA/ldtB/ldtC*) a révélé qu'il présentait une forte abondance de protéines périplasmiques, suggérant que la ME était déstabilisée (Sanders et Pavelka 2013). Toutefois, aucune étude ne fait état de l'observation de l'enveloppe du mutant d'*E. coli* dépourvu des *ldtA*, *ldtB* et *ldtC*.

Conclusion

Pendant plus d'un demi-siècle, depuis sa découverte en 1969 par Volkmar Braun, la lipoprotéine de Braun, ou Lpp, est restée la seule protéine connue pour être couplée de manière covalente au PG chez les bactéries à Gram-négatif (Braun et Rehn 1969). Seulement très récemment, quelques autres exemples ont été identifiés chez les protéobactéries naturellement dépourvues de Lpp (Godessart *et al.* 2021; Sandoz *et al.* 2021). De manière jusqu'ici insoupçonnée, c'est une classe particulière d'OMPs (porines de la membrane externe en tonneau- β) qui sont couplés au PG chez ces bactéries. A la différence de Lpp, couplée aux résidus de mDAP par sa lysine C-terminale, ces porines sont couplées au mDAP par un résidu N-terminal, la glycine ou l'alanine. Lpp et ces porines sont les protéines très abondantes qui jouent un rôle structurant important dans l'enveloppe en attachant la membrane externe à la couche de PG. A cause de leur abondance numérique, ces protéines sont relativement facilement détectables dans le PG par spectrométrie de masse. De ce point de vue, la découverte du couplage covalent d'OutB au PG serait impossible par une telle approche. A propos, en ce moment, nous ne disposons toujours pas d'une confirmation formelle d'un tel phénomène par MS, même en surexprimant une version d'OutB taguée et soluble (dépourvue du segment membranaire). En effet, l'abondance de Lpp couplée au PG empêche la détection de peptides minoritaires par spectrométrie de masse. Il est possible que la majorité des protéines couplées au PG soient faiblement exprimées, comme c'est le cas d'OutB et qu'elles soient donc difficilement détectables. Par ailleurs, d'autres protéines abondantes, cytoplasmiques, comme les chaperonnes GroES/GroEL, ou membranaires, restent piégées dans le saccule, ce qui génère les « bruits de fond » additionnels pour la détection par spectrométrie de masse. D'autre part, les approches consistant à éliminer Lpp par délétion du gène *lpp* semblent nuire à la stabilité de la couche de PG, et empêcher le couplage potentiel des autres protéines (comme c'est le cas d'OutB). Ainsi, on ne peut pas appliquer toutes ces approches et techniques directement. Une des approches alternatives utilisée lors de cette thèse était la fusion de l'extrémité C-terminale issue de quelques protéines-candidates à la place de celle de Lpp. De cette manière, nous avons pu identifier quelques protéines très prometteuses pour les futures études. Dans une autre approche, nous avons choisi pour toutes autres raisons, une pectinase périplasmique PaeX qui paraît être elle aussi couplée au PG. Ainsi, cette étude montre que le phénomène d'attachement covalent des protéines au PG chez les γ -protéobactéries ne se limite pas à Lpp et aux porines de la membrane externe, mais qu'il concerne également des protéines de la membrane interne, ou des protéines périplasmiques. Il est donc probable que ce phénomène soit encore largement sous-estimé chez les bactéries à Gram-négatif.

Références bibliographiques

- van der Aart, Lizah T., Gerwin K. Spijksma, Amy Harms, Waldemar Vollmer, Thomas Hankemeier, et Gilles P. van Wezel. 2018. « High-Resolution Analysis of the Peptidoglycan Composition in *Streptomyces Coelicolor* ». *Journal of Bacteriology* 200(20):e00290-18. doi: 10.1128/JB.00290-18.
- Adam, A., J. F. Petit, J. Wietzerbin-Falszpan, P. Sinay, D. W. Thomas, et E. Lederer. 1969. « L'acide N-glycolyl-muramique, constituant des parois de *Mycobacterium smegmatis*: Identification par spectrométrie de masse ». *FEBS letters* 4(2):87-92. doi: 10.1016/0014-5793(69)80203-6.
- Addinall, S. G., C. Cao, et J. Lutkenhaus. 1997. « FtsN, a Late Recruit to the Septum in *Escherichia Coli* ». *Molecular Microbiology* 25(2):303-9. doi: 10.1046/j.1365-2958.1997.4641833.x.
- Ades, Sarah E., Irina L. Grigorova, et Carol A. Gross. 2003. « Regulation of the Alternative Sigma Factor σ^E during Initiation, Adaptation, and Shutoff of the Extracytoplasmic Heat Shock Response in *Escherichia Coli* ». *Journal of Bacteriology* 185(8):2512-19. doi: 10.1128/JB.185.8.2512-2519.2003.
- Ahmad, Nazia, Sanmati Dugad, Varsha Chauhan, Shubbir Ahmed, Kunal Sharma, Sangita Kachhap, Rana Zaidi, William R. Bishai, Gyanu Lamichhane, et Pankaj Kumar. 2022. « Allosteric Cooperation in SS-Lactam Binding to a Non-Classical Transpeptidase ». *eLife* 11:e73055. doi: 10.7554/eLife.73055.
- Alberts, Bruce, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, et Peter Walter. 2002. « The Lipid Bilayer ». in *Molecular Biology of the Cell. 4th edition*. Garland Science.
- Alcorlo, Martín, David A. Dik, Stefania De Benedetti, Kiran V. Mahasenan, Mijoon Lee, Teresa Domínguez-Gil, Dusan Heseck, Elena Lastochkin, Daniel López, Bill Boggess, Shahriar Mobashery, et Juan A. Hermoso. 2019. « Structural Basis of Denuded Glycan Recognition by SPOR Domains in Bacterial Cell Division ». *Nature Communications* 10(1):5567. doi: 10.1038/s41467-019-13354-4.
- Aldea, M., E. Herrero, M. I. Esteve, et R. Guerrero. 1980. « Surface Density of Major Outer Membrane Proteins in *Salmonella Typhimurium* in Different Growth Conditions ». *Microbiology* 120(2):355-67. doi: 10.1099/00221287-120-2-355.
- Alexandrova, S. S., Y. A. Gladilina, M. V. Pokrovskaya, N. N. Sokolov, et D. D. Zhdanov. 2022. « Mechanisms of development of side effects and drug resistance to asparaginase and ways to overcome them ». *Biomeditsinskaya Khimiya* 68(2):104-16. doi: 10.18097/pbmc20226802104.
- Aliashkevich, Alena, et Felipe Cava. 2022. « LD-Transpeptidases: The Great Unknown among the Peptidoglycan Cross-Linkers ». *The FEBS Journal* 289(16):4718-30. doi: 10.1111/febs.16066.
- Aliprantis, Antonios O., Ruey-Bing Yang, Melanie R. Mark, Shelly Suggett, Brigitte Devaux, Justin D. Radolf, Gary R. Klimpel, Paul Godowski, et Arturo Zychlinsky. 1999. « Cell Activation and Apoptosis by Bacterial Lipoproteins Through Toll-like Receptor-2 ». *Science* 285(5428):736-39. doi: 10.1126/science.285.5428.736.
- Amano, Ken-ichi, Hideyuki Hayashi, Yoshio Araki, et Eiji Ito. 1977. « The Action of Lysozyme on Peptidoglycan with N-Unsubstituted Glucosamine Residues ». *European Journal of Biochemistry* 76(1):299-307. doi: 10.1111/j.1432-1033.1977.tb11596.x.
- Anderson, Erin M., David Sychantha, Dyanne Brewer, Anthony J. Clarke, Jennifer Geddes-McAlister, et Cezar M. Khursigara. 2020. « Peptidoglycomics Reveals Compositional Changes in Peptidoglycan between Biofilm- and Planktonic-Derived *Pseudomonas Aeruginosa* ». *Journal of Biological Chemistry* 295(2):504-16. doi: 10.1074/jbc.RA119.010505.
- Andre, Guillaume, Saulius Kulakauskas, Marie-Pierre Chapot-Chartier, Benjamine Navet, Marie Deghorain, Elvis Bernard, Pascal Hols, et Yves F. Dufrene. 2010. « Imaging the Nanoscale Organization of Peptidoglycan in Living *Lactococcus Lactis* Cells ». *Nature Communications* 1(1):27. doi: 10.1038/ncomms1027.
- Andre, Guillaume, Kees Leenhouts, Pascal Hols, et Yves F. Dufrene. 2008. « Detection and Localization of Single LysM-Peptidoglycan Interactions ». *Journal of Bacteriology* 190(21):7079-86. doi: 10.1128/JB.00519-08.
- Antunes, Luisa Cs, Daniel Poppleton, Andreas Klingl, Alexis Criscuolo, Bruno Dupuy, Céline Brochier-Armanet, Christophe Beloin, et Simonetta Gribaldo. 2016. « Phylogenomic Analysis Supports the Ancestral Presence of LPS-Outer Membranes in the Firmicutes ». *eLife* 5:e14589. doi: 10.7554/eLife.14589.
- Antúñez-Lamas, María, Ezequiel Cabrera-Ordóñez, Emilia López-Solanilla, Rosa Raposo, Oswaldo Trelles-Salazar, Andrés Rodríguez-Moreno, et Pablo Rodríguez-Palenzuela. 2009. « Role of Motility and Chemotaxis in the Pathogenesis of *Dickeya Dadantii* 3937 (Ex *Erwinia Chrysanthemi* 3937) ». *Microbiology* 155(2):434-42. doi: 10.1099/mic.0.022244-0.
- Apostolos, Alexis J., Sean E. Pidgeon, et Marcos M. Pires. 2020. « Remodeling of Cross-Bridges Controls Peptidoglycan Cross-Linking Levels in Bacterial Cell Walls ». *ACS Chemical Biology* 15(5):1261-67. doi: 10.1021/acscchembio.0c00002.
- Araki, Yoshio, Satoko Fukuoka, Shozo Oba, et Eiji Ito. 1971. « Enzymatic Deacetylation of N-Acetylglucosamine Residues in Peptidoglycan from *Bacillus Cereus* Cell Walls ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 45(3):751-58. doi: 10.1016/0006-291X(71)90481-5.
- Arora, Divya, Yogesh Chawla, Basanti Malakar, Archana Singh, et Vinay Kumar Nandicoori. 2018. « The Transpeptidase PbpA and Noncanonical Transglycosylase RodA of *Mycobacterium Tuberculosis* Play Important Roles in Regulating Bacterial Cell Lengths ». *Journal of Biological Chemistry* 293(17):6497-6516. doi: 10.1074/jbc.M117.811190.
- Arrighi, Jean-François, Annick Barre, Bisma Ben Amor, Anne Bersoult, Lidia Campos Soriano, Rossana Mirabella, Fernanda De Carvalho-Niebel, Etienne-Pascal Journet, Michèle Ghérardi, Thierry Huguet, René Geurts, Jean Dénarié, Pierre Rougé, et Clare Gough. 2006. « The *Medicago Truncatula* Lysine Motif-Receptor-Like Kinase Gene Family Includes *NFP* and New Nodule-Expressed Genes ». *Plant Physiology* 142(1):265-79. doi: 10.1104/pp.106.084657.

- Aschtgen, Marie-Stéphanie, Marthe Gavioli, Andrea Dessen, Roland Llobès, et Eric Cascales. 2010. « The SciZ Protein Anchors the Enteroaggregative *Escherichia Coli* Type VI Secretion System to the Cell Wall ». *Molecular Microbiology* 75(4):886-99. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.07028.x.
- Aschtgen, Marie-Stéphanie, Mark S. Thomas, et Eric Cascales. 2010. « Anchoring the Type VI Secretion System to the Peptidoglycan: TssL, TagL, TagP... What Else? » *Virulence* 1(6):535-40. doi: 10.4161/viru.1.6.13732.
- Asmar, Abir T., et Jean-François Collet. 2018. « Lpp, the Braun Lipoprotein, Turns 50—Major Achievements and Remaining Issues ». *FEMS Microbiology Letters* 365(18). doi: 10.1093/femsle/fny199.
- Asmar, Abir T., Josie L. Ferreira, Eli J. Cohen, Seung-Hyun Cho, Morgan Beeby, Kelly T. Hughes, et Jean-François Collet. 2017. « Communication across the Bacterial Cell Envelope Depends on the Size of the Periplasm » édité par F. Hughson. *PLOS Biology* 15(12):e2004303. doi: 10.1371/journal.pbio.2004303.
- Atilano, Magda Luciana, Pedro Matos Pereira, Filipa Vaz, Maria João Catalão, Patricia Reed, Inês Ramos Grilo, Rita Gonçalves Sobral, Petros Ligoxygakis, Mariana Gomes Pinho, et Sérgio Raposo Filipe. 2014. « Bacterial Autolysins Trim Cell Surface Peptidoglycan to Prevent Detection by the Drosophila Innate Immune System ». *eLife* 3:e02277. doi: 10.7554/eLife.02277.
- Atrih, A., P. Zöllner, G. Allmaier, et S. J. Foster. 1996. « Structural Analysis of *Bacillus Subtilis* 168 Endospore Peptidoglycan and Its Role during Differentiation. » *Journal of Bacteriology* 178(21):6173. doi: 10.1128/jb.178.21.6173-6183.1996.
- Atze, Heiner, Yucheng Liang, Jean-Emmanuel Hugonnet, Arnaud Gutierrez, Filippo Rusconi, et Michel Arthur. 2022. « Heavy Isotope Labeling and Mass Spectrometry Reveal Unexpected Remodeling of Bacterial Cell Wall Expansion in Response to Drugs ». *eLife* 11:e72863. doi: 10.7554/eLife.72863.
- Aymeric, Jean-Luc, Annick Guiseppi, Marie-Claire Pascal, et Marc Chippaux. 1988. « Mapping and Regulation of the Cel Genes in *Erwinia Chrysanthemi* ». *Molecular and General Genetics MGG* 211(1):95-101. doi: 10.1007/BF00338398.
- Azuma, I., D. W. Thomas, A. Adam, J. M. Ghuyssen, R. Bonaly, J. F. Petit, et E. Lederer. 1970. « Occurrence of N-Glycolylmuramic Acid in Bacterial Cell Walls: A Preliminary Survey ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 208(3):444-51. doi: 10.1016/0304-4165(70)90217-5.
- Bahadur, Raj, Pavan Kumar Chodiseti, et Manjula Reddy. 2021. « Cleavage of Braun's Lipoprotein Lpp from the Bacterial Peptidoglycan by a Paralog of L,D-Transpeptidases, LdtF ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118(19):e2101989118. doi: 10.1073/pnas.2101989118.
- Bardwell, James C. A., Karen McGovern, et Jon Beckwith. 1991. « Identification of a Protein Required for Disulfide Bond Formation in Vivo ». *Cell* 67(3):581-89. doi: 10.1016/0092-8674(91)90532-4.
- Barnett, Timothy C., et June R. Scott. 2002. « Differential Recognition of Surface Proteins in *Streptococcus Pyogenes* by Two Sortase Gene Homologs ». *Journal of Bacteriology* 184(8):2181-91. doi: 10.1128/JB.184.8.2181-2191.2002.
- Barreteau, Hélène, Andreja Kovac, Audrey Boniface, Matej Sova, Stanislav Gobec, et Didier Blanot. 2008. « Cytoplasmic Steps of Peptidoglycan Biosynthesis ». *FEMS Microbiology Reviews* 32(2):168-207. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00104.x.
- Barton, Brody, Addison Grinnell, et Randy M. Morgenstein. 2021. « Disruption of the MreB Elongasome Is Overcome by Mutations in the Tricarboxylic Acid Cycle ». *Frontiers in Microbiology* 12:664281. doi: 10.3389/fmicb.2021.664281.
- Basuino, Li, Ambre Jousset, J. Andrew N. Alexander, Natalie C. J. Strynadka, Mariana G. Pinho, Henry F. Chambers, et Som S. Chatterjee. 2018. « PBP4 Activity and Its Overexpression Are Necessary for PBP4-Mediated High-Level β -Lactam Resistance ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 73(5):1177-80. doi: 10.1093/jac/dkx531.
- Bateman, Alex, et Mark Bycroft. 2000. « The Structure of a LysM Domain from *E. Coli* Membrane-Bound Lytic Murein Transglycosylase D (MltD) 1 Edited by P. E. Wight ». *Journal of Molecular Biology* 299(4):1113-19. doi: 10.1006/jmbi.2000.3778.
- Battesti, Aurelia, Nadim Majdalani, et Susan Gottesman. 2011. « The RpoS-Mediated General Stress Response in *Escherichia Coli* ». *Annual Review of Microbiology* 65(1):189-213. doi: 10.1146/annurev-micro-090110-102946.
- Battisti, James M., Linda D. Hicks, et Michael F. Minnick. 2011. « A Unique *Coxiella Burnetii* Lipoprotein Involved in Metal Binding (LimB) ». *Microbiology* 157(4):966-76. doi: 10.1099/mic.0.046649-0.
- Beeby, Morgan. 2019. « Evolution of a Family of Molecular Rube Goldberg Contraptions ». *PLOS Biology* 17(8):e3000405. doi: 10.1371/journal.pbio.3000405.
- Bera, Agnieszka, Raja Biswas, Silvia Herbert, et Friedrich Götz. 2006. « The Presence of Peptidoglycan O-Acetyltransferase in Various Staphylococcal Species Correlates with Lysozyme Resistance and Pathogenicity ». *Infection and Immunity* 74(8):4598-4604. doi: 10.1128/IAI.00301-06.
- Berks, Ben C., Tracy Palmer, et Frank Sargent. 2005. « Protein Targeting by the Bacterial Twin-Arginine Translocation (Tat) Pathway ». *Current Opinion in Microbiology* 8(2):174-81. doi: 10.1016/j.mib.2005.02.010.
- Bern, Marshall, Richard Beniston, et Stéphane Mesnage. 2017. « Towards an automated analysis of bacterial peptidoglycan structure ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 409(2):551-60. doi: 10.1007/s00216-016-9857-5.
- Bern, Marshall, Yong J. Kil, et Christopher Becker. 2012. « Byonic: Advanced Peptide and Protein Identification Software ». *Current Protocols in Bioinformatics* Chapter 13:13.20.1-13.20.14. doi: 10.1002/0471250953.bi1320s40.
- Bernal-Cabas, Margarita, Juan Alfonso Ayala, et Tracy L. Raivio. 2015. « The Cpx Envelope Stress Response Modifies Peptidoglycan Cross-Linking via the L,D-Transpeptidase LdtD and the Novel Protein YgaU » édité par T. J. Silhavy. *Journal of Bacteriology* 197(3):603-14. doi: 10.1128/JB.02449-14.
- Bernard, Elvis, Thomas Rolain, Pascal Courtin, Alain Guillot, Philippe Langella, Pascal Hols, et Marie-Pierre Chapot-Chartier. 2011. « Characterization of O-Acetylation of N-Acetylglucosamine: A Novel Structural Variation of Bacterial Peptidoglycan ». *The Journal of Biological Chemistry* 286(27):23950-58. doi: 10.1074/jbc.M111.241414.
- Bernat, Przemysław, Katarzyna Paraszkiwicz, Paulina Siewiera, Magdalena Moryl, Grażyna Płaza, et Joanna Chojniak. 2016. « Lipid Composition in a Strain of *Bacillus Subtilis*, a Producer of Iturin A Lipopeptides That Are Active against Uropathogenic Bacteria ». *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 32(10):157. doi: 10.1007/s11274-016-2126-0.
- Bernhardt, Thomas G., et Piet A. J. De Boer. 2003. « The *Escherichia Coli* Amidase AmiC Is a Periplasmic Septal Ring Component Exported via the Twin-arginine Transport Pathway ». *Molecular Microbiology* 48(5):1171-82. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03511.x.

- Bernstein, Alan, Barry Rolfe, et Kazukiyo Onodera. 1972. « Pleiotropic Properties and Genetic Organization of the *tolA*, *B* Locus of *Escherichia Coli* K-12 ». *Journal of Bacteriology* 112(1):74-83. doi: 10.1128/jb.112.1.74-83.1972.
- Bhat, Aadil H., Minh Tan Nguyen, Asis Das, et Hung Ton-That. 2021. « Anchoring Surface Proteins to the Bacterial Cell Wall by Sortase Enzymes: How It Started and What We Know Now ». *Current Opinion in Microbiology* 60:73-79. doi: 10.1016/j.mib.2021.01.013.
- Bianchet, Mario A., Ying H. Pan, Leighanne A. Brammer Basta, Harry Saavedra, Evan P. Lloyd, Pankaj Kumar, Rohini Mattoo, Craig A. Townsend, et Gyanu Lamichhane. 2017. « Structural insight into the inactivation of Mycobacterium tuberculosis non-classical transpeptidase LdtMt2 by biapenem and tebipenem ». *BMC Biochemistry* 18(1):8. doi: 10.1186/s12858-017-0082-4.
- Biarrotte-Sorin, Sabrina, Jean-Emmanuel Hugonnet, Vanessa Delfosse, Jean-Luc Mainardi, Laurent Gutmann, Michel Arthur, et Claudine Mayer. 2006. « Crystal Structure of a Novel β -Lactam-Insensitive Peptidoglycan Transpeptidase ». *Journal of Molecular Biology* 359(3):533-38. doi: 10.1016/j.jmb.2006.03.014.
- Bielnicki, Jakub, Yancho Devedjiev, Urszula Derewenda, Zbigniew Dauter, Andrzej Joachimiak, et Zygmunt S. Derewenda. 2005. « B. Subtilis ykuD Protein at 2.0 Å Resolution: Insights into the Structure and Function of a Novel, Ubiquitous Family of Bacterial Enzymes ». *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 62(1):144-51. doi: 10.1002/prot.20702.
- Bierne, H  l  ne, Sarkis K. Mazmanian, Matthias Trost, M. Graciela Pucciarelli, Gwen Liu, Pierre Dehoux, the European Listeria Genome Consortium, Lothar J  nsch, Francisco Garcia-del Portillo, Olaf Schneewind, et Pascale Cossart. 2002. « Inactivation of the *srtA* Gene in *Listeria Monocytogenes* Inhibits Anchoring of Surface Proteins and Affects Virulence ». *Molecular Microbiology* 43(4):869-81. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02798.x.
- Bladen, Howard A., et Stephan E. Mergenhagen. 1964. « Ultrastructure of *Veillonella* and morphological correlation of an outer membrane with particles associated with endotoxic activity ». *Journal of Bacteriology* 88(5):1482-92. doi: 10.1128/jb.88.5.1482-1492.1964.
- Blair, David E., Alexander W. Sch  ttelkopf, James I. MacRae, et Daan M. F. van Aalten. 2005. « Structure and Metal-Dependent Mechanism of Peptidoglycan Deacetylase, a Streptococcal Virulence Factor ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(43):15429-34. doi: 10.1073/pnas.0504339102.
- Blair, Jessica M. A., Mark A. Webber, Alison J. Baylay, David O. Ogbolu, et Laura J. V. Piddock. 2015. « Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance ». *Nature Reviews Microbiology* 13(1):42-51. doi: 10.1038/nrmicro3380.
- Blake, C. C. F., D. F. Koenig, G. A. Mair, A. C. T. North, D. C. Phillips, et V. R. Sarma. 1965. « Structure of Hen Egg-White Lysozyme: A Three-Dimensional Fourier Synthesis at 2 Å Resolution ». *Nature* 206(4986):757-61. doi: 10.1038/206757a0.
- Boags, Alistair T., Firdaus Samsudin, et Syma Khalid. 2019. « Binding from Both Sides: TolR and Full-Length OmpA Bind and Maintain the Local Structure of the E. Coli Cell Wall ». *Structure* 27(4):713-724.e2. doi: 10.1016/j.str.2019.01.001.
- Boamah, David, Michael C. Gilmore, Sarah Bourget, Anushka Ghosh, Mohammad J. Hossain, Joseph P. Vogel, Felipe Cava, et Tamara J. O'Connor. 2023. « Peptidoglycan Deacetylation Controls Type IV Secretion and the Intracellular Survival of the Bacterial Pathogen *Legionella Pneumophila* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 120(23):e2119658120. doi: 10.1073/pnas.2119658120.
- Boekhorst, J., M. W. H. J. de Been, M. Kleerebezem, et R. J. Siezen. 2005. « Genome-Wide Detection and Analysis of Cell Wall-Bound Proteins with LPxTG-Like Sorting Motifs ». *Journal of Bacteriology* 187(14):4928-34. doi: 10.1128/JB.187.14.4928-4934.2005.
- Boero, Elena, Ana Rita Cruz, Werner Pansegrau, Cinzia Giovani, Suzan H. M. Rooijackers, Kok P. M. Van Kessel, Jos A. G. Van Strijp, Fabio Bagnoli, et Andrea G. O. Manetti. 2022. « Natural Human Immunity Against Staphylococcal Protein A Relies on Effector Functions Triggered by IgG3 ». *Frontiers in Immunology* 13:834711. doi: 10.3389/fimmu.2022.834711.
- Boneca, Ivo G., Olivier Dussurget, Didier Cabanes, Marie-Anne Nahori, Sandra Sousa, Marc Lecuit, Emmanuel Psylinakis, Vassilis Bouriotis, Jean-Pierre Hugot, Marco Giovannini, Anthony Coyle, John Bertin, Abdelkader Namane, Jean-Claude Rousselle, Nad  ge Cayet, Marie-Christine Pr  vost, Viviane Balloy, Michel Chignard, Dana J. Philpott, Pascale Cossart, et Stephen E. Girardin. 2007. « A Critical Role for Peptidoglycan N-Deacetylation in *Listeria* Evasion from the Host Innate Immune System ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(3):997-1002. doi: 10.1073/pnas.0609672104.
- Bonnet, Julie, Claire Durmort, Maxime Jacq, Isabelle Mortier-Barri  re, Nathalie Campo, Michael S. VanNieuwenhze, Yves V. Brun, Christopher Arthaud, Benoit Gallet, Christine Moriscot, C  cile Morlot, Thierry Vernet, et Anne Marie Di Guilmi. 2017. « Peptidoglycan O-Acetylation Is Functionally Related to Cell Wall Biosynthesis and Cell Division in *Streptococcus pneumoniae* ». *Molecular Microbiology* 106(5):832-46. doi: 10.1111/mmi.13849.
- Bramkamp, Marc. 2010. « The Putative *Bacillus Subtilis* L,D-Transpeptidase YciB Is a Lipoprotein That Localizes to the Cell Poles in a Divisome-Dependent Manner ». *Archives of Microbiology* 192(1):57-68. doi: 10.1007/s00203-009-0532-5.
- Braun, V. 1975. « Covalent Lipoprotein from the Outer Membrane of *Escherichia Coli* ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 415(3):335-77. doi: 10.1016/0304-4157(75)90013-1.
- Braun, V., et K. Rehn. 1969. « Chemical Characterization, Spatial Distribution and Function of a Lipoprotein (Murein-Lipoprotein) of the E. Coli Cell Wall. The Specific Effect of Trypsin on the Membrane Structure ». *European Journal of Biochemistry* 10(3):426-38. doi: 10.1111/j.1432-1033.1969.tb00707.x.
- Braun, Volkmar. 2018. « The Outer Membrane Took Center Stage ». *Annual Review of Microbiology* 72(1):1-24. doi: 10.1146/annurev-micro-090817-062156.
- Braun, Volkmar, Holger Pils, et Patricia Gro  . 1994. « Colicins: Structures, Modes of Action, Transfer through Membranes, and Evolution ». *Archives of Microbiology* 161(3):199-206. doi: 10.1007/BF00248693.
- Brissette, J. L., M. Russel, L. Weiner, et P. Model. 1990. « Phage Shock Protein, a Stress Protein of *Escherichia Coli*. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87(3):862-66. doi: 10.1073/pnas.87.3.862.
- Buist, Girbe, Anton Steen, Jan Kok, et Oscar P. Kuipers. 2008. « LysM, a Widely Distributed Protein Motif for Binding to (Peptido)Glycans ». *Molecular Microbiology* 68(4):838-47. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06211.x.

- Bury-Moné, Stéphanie, Yanoura Nomane, Nancie Reymond, Romain Barbet, Eric Jacquet, Sandrine Imbeaud, Annick Jacq, et Philippe Bouloc. 2009. « Global Analysis of Extracytoplasmic Stress Signaling in *Escherichia Coli* » édité par I. Matic. *PLoS Genetics* 5(9):e1000651. doi: 10.1371/journal.pgen.1000651.
- Caforio, Antonella, et Arnold J. M. Driessen. 2017. « Archaeal Phospholipids: Structural Properties and Biosynthesis ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1862(11):1325-39. doi: 10.1016/j.bbali.2016.12.006.
- Caparrós, M., A. G. Pisabarro, et M. A. De Pedro. 1992. « Effect of D-Amino Acids on Structure and Synthesis of Peptidoglycan in *Escherichia Coli* ». *Journal of Bacteriology* 174(17):5549-59. doi: 10.1128/jb.174.17.5549-5559.1992.
- Carlson, C. A., et J. L. Ingraham. 1983. « Comparison of Denitrification by *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Paracoccus Denitrificans* ». *Applied and Environmental Microbiology* 45(4):1247-53. doi: 10.1128/aem.45.4.1247-1253.1983.
- Carlstrom, D. 1957. « The Crystal Structure of Alpha-Chitin (Poly-N-Acetyl-D-Glucosamine) ». *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 3(5):669-83. doi: 10.1083/jcb.3.5.669.
- Carpenter, Timothy S., Jamie Parkin, et Syma Khalid. 2016. « The Free Energy of Small Solute Permeation through the *Escherichia Coli* Outer Membrane Has a Distinctly Asymmetric Profile ». *Journal of Physical Chemistry Letters* 7(17). doi: 10.1021/acs.jpcl.6b01399.
- Carter, Tyson, Ryan N. C. Buensuceso, Stephanie Tammam, Ryan P. Lamers, Hanjeong Harvey, P. Lynne Howell, et Lori L. Burrows. 2017. « The Type IVa Pilus Machinery Is Recruited to Sites of Future Cell Division » édité par L. Søgaard-Andersen. *mBio* 8(1):e02103-16. doi: 10.1128/mBio.02103-16.
- Cascales, Eric, Alain Bernadac, Marthe Gavioli, Jean-Claude Lazzaroni, et Roland Lloubes. 2002. « Pal Lipoprotein of *Escherichia coli* Plays a Major Role in Outer Membrane Integrity ». *Journal of bacteriology* 184:754-59. doi: 10.1128/JB.184.3.754-759.2002.
- Cavalier-Smith, Thomas. 2006. « Cell Evolution and Earth History: Stasis and Revolution ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 361(1470):969-1006. doi: 10.1098/rstb.2006.1842.
- Caveney, Nathanael A., Guillermo Caballero, Henri Voedts, Ana Niciforovic, Liam J. Worrall, Marija Vuckovic, Matthieu Fonvielle, Jean-Emmanuel Hugonnet, Michel Arthur, et Natalie C. J. Strynadka. 2019. « Structural Insight into YcbB-Mediated Beta-Lactam Resistance in *Escherichia Coli* ». *Nature Communications* 10(1):1849. doi: 10.1038/s41467-019-09507-0.
- Chang, Arthur, Ravinder Kaur, Lea Vacca Michel, Janet R. Casey, et Michael E. Pichichero. 2011. « *Haemophilus Influenzae* Vaccine Candidate Outer Membrane Protein P6 Is Not Conserved in All Strains ». *Human Vaccines* 7(1):102-5. doi: 10.4161/hv.7.1.13351.
- Chang, James D., Ashley G. Wallace, Erin E. Foster, et Sung Joon Kim. 2018. « Peptidoglycan Compositional Analysis of *Enterococcus faecalis* Biofilm by Stable Isotope Labeling by Amino Acids in a Bacterial Culture ». *Biochemistry* 57(7):1274-83. doi: 10.1021/acs.biochem.7b01207.
- Chao, Yanjie, et Jörg Vogel. 2016. « A 3' UTR-Derived Small RNA Provides the Regulatory Noncoding Arm of the Inner Membrane Stress Response ». *Molecular Cell* 61(3):352-63. doi: 10.1016/j.molcel.2015.12.023.
- Chaudhry, S. B., Veve, M. P., & Wagner, J. L. (2019). Cephalosporins: A Focus on Side Chains and β -Lactam Cross-Reactivity. *Pharmacy*, 7(3), 103. <https://doi.org/10.3390/pharmacy7030103>
- Cheng, Lifeng, Shengwen Duan, Ke Zheng, Xiangyuan Feng, Qi Yang, Zhiyuan Liu, Zhengchu Liu, et Yuande Peng. 2019. « An Alkaline Pectate Lyase D from *Dickeya Dadantii* DCE-01: Clone, Expression, Characterization, and Potential Application in Ramie Bio-Degumming ». *Textile Research Journal* 89(11):2075-83. doi: 10.1177/0040517518790971.
- Chiaradia, Laura, Cyril Lefebvre, Julien Parra, Julien Marcoux, Odile Burlet-Schiltz, Gilles Etienne, Maryelle Tropis, et Mamadou Daffé. 2017. « Dissecting the Mycobacterial Cell Envelope and Defining the Composition of the Native Mycomembrane ». *Scientific Reports* 7(1):12807. doi: 10.1038/s41598-017-12718-4.
- Cho, Hongbaek, Tsuyoshi Uehara, et Thomas G. Bernhardt. 2014. « Beta-Lactam Antibiotics Induce a Lethal Malfunctioning of the Bacterial Cell Wall Synthesis Machinery ». *Cell* 159(6):1300-1311. doi: 10.1016/j.cell.2014.11.017.
- Cianciotto, Nicholas P., et Richard C. White. 2017. « Expanding Role of Type II Secretion in Bacterial Pathogenesis and Beyond ». *Infection and Immunity* 85(5):e00014-17. doi: 10.1128/IAI.00014-17.
- Clancy, Kathleen W., Jeffrey A. Melvin, et Dewey G. McCafferty. 2010. « Sortase Transpeptidases: Insights into Mechanism, Substrate Specificity, and Inhibition ». *Biopolymers* 94(4):385-96. doi: 10.1002/bip.21472.
- Cohen, Eli J., Josie L. Ferreira, Mark S. Ladinsky, Morgan Beeby, et Kelly T. Hughes. 2017. « Nanoscale-Length Control of the Flagellar Driveshaft Requires Hitting the Tethered Outer Membrane ». *Science* 356(6334):197-200. doi: 10.1126/science.aam6512.
- Cole, Gregory B., Thomas J. Bateman, et Trevor F. Moraes. 2021. « The Surface Lipoproteins of Gram-Negative Bacteria: Protectors and Foragers in Harsh Environments ». *Journal of Biological Chemistry* 296:100147. doi: 10.1074/jbc.REV120.008745.
- Coleman, Gareth A., Adrián A. Davín, Tara A. Mahendrarajah, Lénárd L. Szánthó, Anja Spang, Philip Hugenholtz, Gergely J. Szöllősi, et Tom A. Williams. 2021. « A Rooted Phylogeny Resolves Early Bacterial Evolution ». *Science* 372(6542):eabe0511. doi: 10.1126/science.abe0511.
- Condemine, Guy, et Bastien Le Derout. 2022. « Identification of New *Dickeya Dadantii* Virulence Factors Secreted by the Type 2 Secretion System » édité par C.-H. Kuo. *PLOS ONE* 17(4):e0265075. doi: 10.1371/journal.pone.0265075.
- Condemine, Guy, et Vladimir E. Shevchik. 2000. « Overproduction of the Secretin OutD Suppresses the Secretion Defect of an *Erwinia Chrysanthemi* outB Mutant ». *Microbiology* 146(3):639-47. doi: 10.1099/00221287-146-3-639.
- Costechareyre, Denis, Séverine Balmant, Guy Condemine, et Yvan Rahbé. 2012. « *Dickeya Dadantii*, a Plant Pathogenic Bacterium Producing Cyt-like Entomotoxins, Causes Septicemia in the Pea Aphid *Acyrtosiphon Pisum* ». *PLoS One* 7(1):e30702. doi: 10.1371/journal.pone.0030702.
- Cowles, Charles E., Yongfeng Li, Martin F. Semmelhack, Ileana M. Cristea, et Thomas J. Silhavy. 2011. « The Free and Bound Forms of Lpp Occupy Distinct Subcellular Locations in *Escherichia Coli*: Free-Form Lpp Is Surface-Exposed in *E. Coli* ». *Molecular Microbiology* 79(5):1168-81. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07539.x.

- Crisóstomo, M. Inês, Waldemar Vollmer, Arun S. Kharat, Silja Inhülsen, Florian Gehre, Stephan Buckenmaier, et Alexander Tomasz. 2006. « Attenuation of Penicillin Resistance in a Peptidoglycan O-Acetyl Transferase Mutant of *Streptococcus Pneumoniae* ». *Molecular Microbiology* 61(6):1497-1509. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05340.x.
- Cushnie, T. P. Tim, Noëlle H. O'Driscoll, et Andrew J. Lamb. 2016. « Morphological and Ultrastructural Changes in Bacterial Cells as an Indicator of Antibacterial Mechanism of Action ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 73(23):4471-92. doi: 10.1007/s00018-016-2302-2.
- Daffé, Mamadou, et Hedia Marrakchi. 2019. « Unraveling the Structure of the Mycobacterial Envelope ». *Microbiology Spectrum* 7(4). doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0027-2018.
- Dahl, Jan-Ulrik, Philipp Koldewey, Loïc Salmon, Scott Horowitz, James C. A. Bardwell, et Ursula Jakob. 2015. « HdeB Functions as an Acid-Protective Chaperone in Bacteria ». *Journal of Biological Chemistry* 290(1):65-75. doi: 10.1074/jbc.M114.612986.
- Dai, Yunfei, Victor Pinedo, Amy Y. Tang, Felipe Cava, et Edward Geisinger. 2021. « A New Class of Cell Wall-Recycling L,D-Carboxypeptidase Determines β -Lactam Susceptibility and Morphogenesis in *Acinetobacter Baumannii* ». *mBio*. doi: 10.1128/mBio.02786-21.
- Davies, J. K., et P. Reeves. 1975. « Genetics of Resistance to Colicins in *Escherichia Coli* K-12: Cross-Resistance among Colicins of Group A ». *Journal of Bacteriology* 123(1):102-17. doi: 10.1128/jb.123.1.102-117.1975.
- De Duve, Christian, et Robert Wattiaux. 1966. « Functions of Lysosomes ». *Annual Review of Physiology* 28(1):435-92. doi: 10.1146/annurev.ph.28.030166.002251.
- De Zwaig, Rosa Nagel, et S. E. Luria. 1967. « Genetics and Physiology of Colicin-Tolerant Mutants of *Escherichia Coli* ». *Journal of Bacteriology* 94(4):1112-23. doi: 10.1128/jb.94.4.1112-1123.1967.
- Deghelt, Michaël, Seung-Hyun Cho, Sander K. Govers, Arne Janssens, Alix Dachsbeck, Han K. Remaut, et Jean-François Collet. 2023. The Outer Membrane and Peptidoglycan Layer Form a Single Mechanical Device Balancing Turgor. preprint. Microbiology. doi: 10.1101/2023.04.29.538579.
- Delhaye, Antoine, Jean-François Collet, et Géraldine Laloux. 2016. « Fine-Tuning of the Cpx Envelope Stress Response Is Required for Cell Wall Homeostasis in *Escherichia Coli* » édité par B. Bassler. *mBio* 7(1):e00047-16. doi: 10.1128/mBio.00047-16.
- Demchick, P., et A. L. Koch. 1996. « The Permeability of the Wall Fabric of *Escherichia Coli* and *Bacillus Subtilis*. » *Journal of Bacteriology* 178(3):768-73. doi: 10.1128/jb.178.3.768-773.1996.
- Deng, L., D. L. Kasper, T. P. Krick, et M. R. Wessels. 2000. « Characterization of the Linkage between the Type III Capsular Polysaccharide and the Bacterial Cell Wall of Group B *Streptococcus* ». *The Journal of Biological Chemistry* 275(11):7497-7504. doi: 10.1074/jbc.275.11.7497.
- Denise, Rémi, Sophie S. Abby, et Eduardo P. C. Rocha. 2019. « Diversification of the Type IV Filament Superfamily into Machines for Adhesion, Protein Secretion, DNA Uptake, and Motility ». *PLoS Biology* 17(7):e3000390. doi: 10.1371/journal.pbio.3000390.
- Denise, Rémi, Sophie S. Abby, et Eduardo P. C. Rocha. 2020. « The Evolution of Protein Secretion Systems by Co-Option and Tinkering of Cellular Machineries ». *Trends in Microbiology* 28(5):372-86. doi: 10.1016/j.tim.2020.01.005.
- Denome, Sylvia A., Pamela K. Elf, Thomas A. Henderson, David E. Nelson, et Kevin D. Young. 1999. « *Escherichia Coli* Mutants Lacking All Possible Combinations of Eight Penicillin Binding Proteins: Viability, Characteristics, and Implications for Peptidoglycan Synthesis ». *Journal of Bacteriology* 181(13):3981-93. doi: 10.1128/JB.181.13.3981-3993.1999.
- Di Girolamo, Salvatore, Chasper Puorger, Mara Castiglione, Maren Vogel, Rémy Gébleux, Manfred Briendl, Tamara Hell, Roger R. Beerli, Ulf Grawunder, et Georg Lipps. 2019. « Characterization of the Housekeeping Sortase from the Human Pathogen *Propionibacterium Acnes*: First Investigation of a Class F Sortase ». *Biochemical Journal* 476(4):665-82. doi: 10.1042/BCJ20180885.
- Diao, Jingyu, Catrien Bouwman, Donghong Yan, Jing Kang, Anand K. Katakam, Peter Liu, Homer Pantua, Alexander R. Abbas, Nicholas N. Nickerson, Cary Austin, Mike Reichelt, Wendy Sandoval, Min Xu, Chris Whitfield, et Sharookh B. Kapadia. 2017. « Peptidoglycan Association of Murein Lipoprotein Is Required for KpsD-Dependent Group 2 Capsular Polysaccharide Expression and Serum Resistance in a Uropathogenic *Escherichia Coli* Isolate » édité par G. B. Pier. *mBio* 8(3):e00603-17. doi: 10.1128/mBio.00603-17.
- Diez, Simon, Jaewook Ryu, Kelvin Caban, Ruben L. Gonzalez, et Jonathan Dworkin. 2020. « The Alarmones (p)ppGpp Directly Regulate Translation Initiation during Entry into Quiescence ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117(27):15565-72. doi: 10.1073/pnas.1920013117.
- Dik, David A., Nan Zhang, Emily J. Sturgell, Brittany B. Sanchez, Jason S. Chen, Bill Webb, Kimberly G. Vanderpool, et Peter G. Schultz. 2021. « A Synthetic 5,3-Cross-Link in the Cell Wall of Rod-Shaped Gram-Positive Bacteria ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118(11):e2100137118. doi: 10.1073/pnas.2100137118.
- Dion, Michael F., Mrinal Kapoor, Yingjie Sun, Sean Wilson, Joel Ryan, Antoine Vigouroux, Sven Van Teeffelen, Rudolf Oldenbourg, et Ethan C. Garner. 2019. « *Bacillus Subtilis* Cell Diameter Is Determined by the Opposing Actions of Two Distinct Cell Wall Synthetic Systems ». *Nature Microbiology* 4(8):1294-1305. doi: 10.1038/s41564-019-0439-0.
- Disconzi, E., I. Guilvout, M. Chami, M. Masi, G. H. M. Huysmans, A. P. Pugsley, et N. Bayan. 2014. « Bacterial Secretins Form Constitutively Open Pores Akin to General Porins ». *Journal of Bacteriology* 196(1):121-28. doi: 10.1128/JB.00750-13.
- Dittoe, Dana K., Ravi D. Barabote, Michael J. Rothrock, et Steven C. Ricke. 2020. « Assessment of a Potential Role of *Dickeya dadantii* DSM 18020 as a Pectinase Producer for Utilization in Poultry Diets Based on *in silico* Analyses ». *Frontiers in Microbiology* 11:751. doi: 10.3389/fmicb.2020.00751.
- Do, Truc, Julia E. Page, et Suzanne Walker. 2020. « Uncovering the Activities, Biological Roles, and Regulation of Bacterial Cell Wall Hydrolases and Tailoring Enzymes ». *Journal of Biological Chemistry* 295(10):3347-61. doi: 10.1074/jbc.REV119.010155.
- Domínguez-Escobar, Julia, Arnaud Chastanet, Alvaro H. Crevenna, Vincent Fromion, Roland Wedlich-Söldner, et Rut Carballido-López. 2011. « Processive Movement of MreB-Associated Cell Wall Biosynthetic Complexes in Bacteria ». *Science* 333(6039):225-28. doi: 10.1126/science.1203466.

- Domínguez-Gil, Teresa, Rafael Molina, Martín Alcorlo, et Juan A. Hermoso. 2016. « Renew or Die: The Molecular Mechanisms of Peptidoglycan Recycling and Antibiotic Resistance in Gram-Negative Pathogens ». *Drug Resistance Updates* 28:91-104. doi: 10.1016/j.drug.2016.07.002.
- Dougherty, T. J. 1983. « Peptidoglycan Biosynthesis in *Neisseria Gonorrhoeae* Strains Sensitive and Intrinsically Resistant to Beta-Lactam Antibiotics ». *Journal of Bacteriology* 153(1):429-35. doi: 10.1128/jb.153.1.429-435.1983.
- Dougherty, T. J. 1985. « Involvement of a Change in Penicillin Target and Peptidoglycan Structure in Low-Level Resistance to Beta-Lactam Antibiotics in *Neisseria Gonorrhoeae* ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 28(1):90-95. doi: 10.1128/AAC.28.1.90.
- Dragan, Anatoly I., Sergey A. Potekhin, Andrei Sivolob, Min Lu, et Peter L. Privalov. 2004. « Kinetics and Thermodynamics of the Unfolding and Refolding of the Three-Stranded α -Helical Coiled Coil, Lpp-56 ». *Biochemistry* 43(47):14891-900. doi: 10.1021/bi048365+.
- Dramsi, Shaynoor, Sophie Magnet, Sophie Davison, et Michel Arthur. 2008. « Covalent Attachment of Proteins to Peptidoglycan ». *FEMS Microbiology Reviews* 32(2):307-20. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00102.x.
- Duprey, Alexandre, Georgi Muskhelishvili, Sylvie Reverchon, et William Nasser. 2016. « Temporal Control of *Dickeya Dadantii* Main Virulence Gene Expression by Growth Phase-Dependent Alteration of Regulatory Nucleoprotein Complexes ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1859(11):1470-80. doi: 10.1016/j.bbagr.2016.08.001.
- Dupuis, Brice, Pacifique Nkuriyngoma, et Frédérique Van Gijsegem. 2021. « Economic Impact of *Pectobacterium* and *Dickeya* Species on Potato Crops: A Review and Case Study ». P. 263-82 in *Plant Diseases Caused by Dickeya and Pectobacterium Species*, édité par F. Van Gijsegem, J. M. Van Der Wolf, et I. K. Toth. Cham: Springer International Publishing.
- Edoo, Zainab, Michel Arthur, et Jean-Emmanuel Hugonnet. 2017. « Reversible Inactivation of a Peptidoglycan Transpeptidase by a β -Lactam Antibiotic Mediated by β -Lactam-Ring Recyclization in the Enzyme Active Site ». *Scientific Reports* 7(1):9136. doi: 10.1038/s41598-017-09341-8.
- Edwards, Meredith C., Emily DeCrescenzo Henriksen, Lorraine P. Yomano, Brian C. Gardner, Lekh N. Sharma, Lonnie O. Ingram, et Joy Doran Peterson. 2011. « Addition of Genes for Cellobiase and Pectinolytic Activity in *Escherichia Coli* for Fuel Ethanol Production from Pectin-Rich Lignocellulosic Biomass ». *Applied and Environmental Microbiology* 77(15):5184-91. doi: 10.1128/AEM.05700-11.
- Effantin, Géraldine, Corinne Rivasseau, Marina Gromova, Richard Bligny, et Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat. 2011. « Massive Production of Butanediol during Plant Infection by Phytopathogenic Bacteria of the Genera *Dickeya* and *Pectobacterium* ». *Molecular Microbiology* 82(4):988-97. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07881.x.
- Egan, Alexander J. F., Jeff Errington, et Waldemar Vollmer. 2020. « Regulation of Peptidoglycan Synthesis and Remodelling ». *Nature Reviews Microbiology* 18(8):446-60. doi: 10.1038/s41579-020-0366-3.
- Ekiert, Damian C., Gira Bhabha, Georgia L. Isom, Garrett Greenan, Sergey Ovchinnikov, Ian R. Henderson, Jeffery S. Cox, et Ronald D. Vale. 2017. « Architectures of Lipid Transport Systems for the Bacterial Outer Membrane ». *Cell* 169(2):273-285.e17. doi: 10.1016/j.cell.2017.03.019.
- Elhosseiny, Noha M., et Ahmed S. Attia. 2018. « *Acinetobacter* : An Emerging Pathogen with a Versatile Secretome ». *Emerging Microbes & Infections* 7(1):1-15. doi: 10.1038/s41426-018-0030-4.
- Emami, Kaveh, Aurelie Guyet, Yoshikazu Kawai, Jenny Devi, Ling J. Wu, Nick Allenby, Richard A. Daniel, et Jeff Errington. 2017. « Corrigendum: RodA as the Missing Glycosyltransferase in *Bacillus Subtilis* and Antibiotic Discovery for the Peptidoglycan Polymerase Pathway ». *Nature Microbiology* 2:17019. doi: 10.1038/nmicrobiol.2017.19.
- Ercan, Bilge, Wen-Yi Low, Xuejun Liu, et Shu-Sin Chng. 2019. « Characterization of Interactions and Phospholipid Transfer between Substrate Binding Proteins of the OmpC-Mla System ». *Biochemistry* 58(2):114-19. doi: 10.1021/acs.biochem.8b00897.
- Erdemli, Sabri B., Radhika Gupta, William R. Bishai, Gyanu Lamichhane, L. Mario Amzel, et Mario A. Bianchet. 2012. « Targeting the Cell Wall of *Mycobacterium Tuberculosis*: Structure and Mechanism of L,D-Transpeptidase 2 ». *Structure* 20(12):2103-15. doi: 10.1016/j.str.2012.09.016.
- Erickson, Harold P. 2017. « How Bacterial Cell Division Might Cheat Turgor Pressure - a Unified Mechanism of Septal Division in Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria ». *BioEssays* 39(8):1700045. doi: 10.1002/bies.201700045.
- Erickson, Harold P. 2021. « How Teichoic Acids Could Support a Periplasm in Gram-Positive Bacteria, and Let Cell Division Cheat Turgor Pressure ». *Frontiers in Microbiology* 12:664704. doi: 10.3389/fmicb.2021.664704.
- Errington, Jeff. 2013. « L-Form Bacteria, Cell Walls and the Origins of Life ». *Open Biology* 3(1):120143. doi: 10.1098/rsob.120143.
- Fadl, A. A., C. L. Galindo, J. Sha, G. R. Klimpel, V. L. Popov, et A. K. Chopra. 2006. « Global Gene Expression of a Murein (Braun) Lipoprotein Mutant of *Salmonella Enterica Serovar Typhimurium* by Microarray Analysis ». *Gene* 374:121-27. doi: 10.1016/j.gene.2006.01.034.
- Fairman, James W., Nicholas Noinaj, et Susan K. Buchanan. 2011. « The Structural Biology of β -Barrel Membrane Proteins: A Summary of Recent Reports ». *Current Opinion in Structural Biology* 21(4):523-31. doi: 10.1016/j.sbi.2011.05.005.
- Fakhar, Zeynab, Thavendran Govender, Gyanu Lamichhane, Glenn E. M. Maguire, Hendrik G. Kruger, et Bahareh Honarparvar. 2017. « Computational Model for the Acylation Step of the β -Lactam Ring: Potential Application for L,D-Transpeptidase 2 in *Mycobacterium Tuberculosis* ». *Journal of Molecular Structure* 1128:94-102. doi: 10.1016/j.molstruc.2016.08.049.
- Ferrandez, Yann, et Guy Condemine. 2008. « Novel Mechanism of Outer Membrane Targeting of Proteins in Gram-Negative Bacteria ». *Molecular Microbiology* 69(6):1349-57. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06366.x.
- Filloux, Alain. 2022. « Bacterial Protein Secretion Systems: Game of Types: This Article Is Part of the Bacterial Cell Envelopes Collection. » *Microbiology* 168(5). doi: 10.1099/mic.0.001193.
- Fischetti, Vincent A. 2019. « Surface Proteins on Gram-Positive Bacteria ». *Microbiology spectrum* 7(4):10.1128/microbiolspec.GPP3-0012-2018. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0012-2018.
- Flores-Kim, Josué, et Andrew J. Darwin. 2016. « The Phage Shock Protein Response ». *Annual Review of Microbiology* 70:83-101. doi: 10.1146/annurev-micro-102215-095359.
- Frain, Kelly M., Colin Robinson, et Jan Maarten van Dijl. 2019. « Transport of Folded Proteins by the Tat System ». *The Protein Journal* 38(4):377-88. doi: 10.1007/s10930-019-09859-y.

- Francis, Zanah K., Akeisha N. Sanders, Dean C. Crick, Seababata Mahapatra, M. Nurul Islam, et Martin S. Pavelka. 2023. « LdtC Is a Key L,D-Transpeptidase for Peptidoglycan Assembly in *Mycobacterium Smegmatis* » édité par P. A. Champion. *Journal of Bacteriology* 205(1):e00424-22. doi: 10.1128/jb.00424-22.
- Fukushima, Tatsuya, Toshihiko Kitajima, et Junichi Sekiguchi. 2005. « A Polysaccharide Deacetylase Homologue, PdaA, in *Bacillus subtilis* Acts as an N-Acetylmuramic Acid Deacetylase In Vitro ». *Journal of Bacteriology* 187(4):1287-92. doi: 10.1128/JB.187.4.1287-1292.2005.
- Fukushima, Tatsuya, Hiroki Yamamoto, Abdelmadjid Atrih, Simon J. Foster, et Junichi Sekiguchi. 2002. « A Polysaccharide Deacetylase Gene (pdaA) Is Required for Germination and for Production of Muramic Delta-Lactam Residues in the Spore Cortex of *Bacillus Subtilis* ». *Journal of Bacteriology* 184(21):6007-15. doi: 10.1128/JB.184.21.6007-6015.2002.
- Gan, L., S. Chen, et G. J. Jensen. 2008. « Molecular Organization of Gram-Negative Peptidoglycan ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(48):18953-57. doi: 10.1073/pnas.0808035105.
- García-Gómez, Elizabeth, Norma Espinosa, Javier De La Mora, Georges Dreyfus, et Bertha González-Pedrajo. 2011. « The Muramidase EtgA from Enteropathogenic *Escherichia Coli* Is Required for Efficient Type III Secretion ». *Microbiology* 157(4):1145-60. doi: 10.1099/mic.0.045617-0.
- Garvey, Kevin J., Mohammad S. Saedi, et Junetsu Ito. 1986. « Nucleotide Sequence of *Bacillus* Phage ϕ 29 Genes 14 and 15: Homology of Gene 15 with Other Phage Lysozymes ». *Nucleic Acids Research* 14(24):10001-8. doi: 10.1093/nar/14.24.10001.
- Gebicki, J. M., et A. M. James. 1960. « The Preparation and Properties of Spheroplasts of *Aerobacter Aerogenes* ». *Journal of General Microbiology* 23(1):9-18. doi: 10.1099/00221287-23-1-9.
- Gerbaud, Guillaume, Brice Barbat, Mathilde Tribout, Emilien Etienne, Valérie Belle, Badreddine Douzi, Romé Voulhoux, et Alessio Bonucci. 2023. « Refining the Dynamic Network of T2SS Endopilus Tip Heterocomplex Combining cw-EPR and Nitroxide-Gd^{III} Distance Measurements ». *ChemBioChem* 24(15):e202300099. doi: 10.1002/cbic.202300099.
- Gerding, Matthew A., Yasuyuki Ogata, Nicole D. Pecora, Hironori Niki, et Piet A. J. De Boer. 2007. « The *Trans*-envelope Tol-Pal Complex Is Part of the Cell Division Machinery and Required for Proper Outer-membrane Invagination during Cell Constriction in *E. Coli* ». *Molecular Microbiology* 63(4):1008-25. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05571.x.
- Gessmann, Dennis, Yong Hee Chung, Emily J. Danoff, Ashlee M. Plummer, Clifford W. Sandlin, Nathan R. Zaccai, et Karen G. Fleming. 2014. « Outer membrane β -barrel protein folding is physically controlled by periplasmic lipid head groups and BamA ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(16):5878-83. doi: 10.1073/pnas.1322473111.
- Ghosal, Debnath, Ki Woo Kim, Huaixin Zheng, Mohammed Kaplan, Hilary K. Truchan, Alberto E. Lopez, Ian E. McIntire, Joseph P. Vogel, Nicholas P. Cianciotto, et Grant J. Jensen. 2019. « In Vivo Structure of the *Legionella* Type II Secretion System by Electron Cryotomography ». *Nature Microbiology* 4(12):2101-8. doi: 10.1038/s41564-019-0603-6.
- Gimenez, Maxime Rémi, Govind Chandra, Perrine Van Overvelt, Romé Voulhoux, Sophie Blevés, et Bérengère Ize. 2018. « Genome Wide Identification and Experimental Validation of *Pseudomonas Aeruginosa* Tat Substrates ». *Scientific Reports* 8(1):11950. doi: 10.1038/s41598-018-30393-x.
- Gimenez-Ibanez, Selena, Vardis Ntoukakis, et John P. Rathjen. 2009. « The LysM Receptor Kinase CERK1 Mediates Bacterial Perception in *Arabidopsis* ». *Plant Signaling & Behavior* 4(6):539-41. doi: 10.4161/psb.4.6.8697.
- Glauner, B. 1988. « Separation and Quantification of Muropeptides with High-Performance Liquid Chromatography ». *Analytical Biochemistry* 172(2):451-64. doi: 10.1016/0003-2697(88)90468-x.
- Godessart, Pierre, Adélie Lannoy, Marc Dieu, Sander E. Van der Verren, Patrice Soumillon, Jean-François Collet, Han Remaut, Patricia Renard, et Xavier De Bolle. 2021. « β -Barrels Covalently Link Peptidoglycan and the Outer Membrane in the α -Proteobacterium *Brucella Abortus* ». *Nature Microbiology* 6(1):27-33. doi: 10.1038/s41564-020-00799-3.
- Goodell, E. W., et U. Schwarz. 1985. « Release of Cell Wall Peptides into Culture Medium by Exponentially Growing *Escherichia Coli* ». *Journal of Bacteriology* 162(1):391-97. doi: 10.1128/jb.162.1.391-397.1985.
- Grabowicz, Marcin, Daria Koren, et Thomas J. Silhavy. 2016. « The CpxQ sRNA Negatively Regulates Skp To Prevent Mistargeting of β -Barrel Outer Membrane Proteins into the Cytoplasmic Membrane » édité par S. J. Hultgren. *mBio* 7(2):e00312-16. doi: 10.1128/mBio.00312-16.
- Graham, L. L., & Beveridge, T. J. (1994). Structural differentiation of the *Bacillus subtilis* 168 cell wall. *Journal of Bacteriology*, 176(5), 1413-1421. <https://doi.org/10.1128/jb.176.5.1413-1421.1994>
- Griffiths, Carole S., George F. Barrowclough, Jeff G. Groth, et Lisa A. Mertz. 2007. « Phylogeny, Diversity, and Classification of the Accipitridae Based on DNA Sequences of the RAG-1 Exon ». *Journal of Avian Biology* 38(5):587-602. doi: 10.1111/j.0908-8857.2007.03971.x.
- Gu, Shuang, Geoff Kelly, Xiaohui Wang, Tom Frenkiel, Vladimir E. Shevchik, et Richard W. Pickersgill. 2012. « Solution Structure of Homology Region (HR) Domain of Type II Secretion System ». *Journal of Biological Chemistry* 287(12):9072-80. doi: 10.1074/jbc.M111.300624.
- Gu, Shuang, Vladimir E. Shevchik, Rosie Shaw, Richard W. Pickersgill, et James A. Garnett. 2017. « The Role of Intrinsic Disorder and Dynamics in the Assembly and Function of the Type II Secretion System ». *Biochimica Et Biophysica Acta. Proteins and Proteomics* 1865(10):1255-66. doi: 10.1016/j.bbapap.2017.07.006.
- Gu, Yinghong, Huanyu Li, Haohao Dong, Yi Zeng, Zhengyu Zhang, Neil G. Paterson, Phillip J. Stansfeld, Zhongshan Wang, Yizheng Zhang, Wenjian Wang, et Changjiang Dong. 2016. « Structural Basis of Outer Membrane Protein Insertion by the BAM Complex ». *Nature* 531(7592):64-69. doi: 10.1038/nature17199.
- Guilvout, Ingrid, Mohamed Chami, Andreas Engel, Anthony P. Pugsley, et Nicolas Bayan. 2006. « Bacterial outer membrane secretin PulD assembles and inserts into the inner membrane in the absence of its pilotin ». *The EMBO Journal* 25(22):5241-49. doi: 10.1038/sj.emboj.7601402.
- Gumbart, James C., Morgan Beeby, Grant J. Jensen, et Benoît Roux. 2014. « *Escherichia Coli* Peptidoglycan Structure and Mechanics as Predicted by Atomic-Scale Simulations » édité par M. S. Alber. *PLoS Computational Biology* 10(2):e1003475. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003475.

- Gupta, Radhey S. 2011. « Origin of Diderm (Gram-Negative) Bacteria: Antibiotic Selection Pressure Rather than Endosymbiosis Likely Led to the Evolution of Bacterial Cells with Two Membranes ». *Antonie van Leeuwenhoek* 100(2):171-82. doi: 10.1007/s10482-011-9616-8.
- Hagenmaier, S., Y. D. Stierhof, et U. Henning. 1997. « A New Periplasmic Protein of *Escherichia Coli* Which Is Synthesized in Spheroplasts but Not in Intact Cells ». *Journal of Bacteriology* 179(6):2073-76. doi: 10.1128/jb.179.6.2073-2076.1997.
- Haidar, Riad. 2016. « Antoni van Leeuwenhoek ». *Photoniques* (82):19-24. doi: 10.1051/photon/20168217.
- Halbig, Dirk, Thomas Wiegert, Natascha Blaudeck, Roland Freudl, et Georg A. Sprenger. 1999. « The Efficient Export of NADP-Containing Glucose-Fructose Oxidoreductase to the Periplasm of *Zymomonas Mobilis* Depends Both on an Intact Twin-Arginine Motif in the Signal Peptide and on the Generation of a Structural Export Signal Induced by Cofactor Binding ». *European Journal of Biochemistry* 263(2):543-51. doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00536.x.
- Hammes, W., K. H. Schleifer, et O. Kandler. 1973. « Mode of Action of Glycine on the Biosynthesis of Peptidoglycan ». *Journal of Bacteriology* 116(2):1029-53. doi: 10.1128/jb.116.2.1029-1053.1973.
- Hamsanathan, Shruthi, et Siegfried M. Musser. 2018. « The Tat protein transport system: intriguing questions and conundrums ». *FEMS Microbiology Letters* 365(12):fny123. doi: 10.1093/femsle/fny123.
- Han, Long, Jiangge Zheng, Yan Wang, Xu Yang, Yanqing Liu, Chuanqi Sun, Baohua Cao, Haizhen Zhou, Dongchun Ni, Jizhong Lou, Yongfang Zhao, et Yihua Huang. 2016. « Structure of the BAM Complex and Its Implications for Biogenesis of Outer-Membrane Proteins ». *Nature Structural & Molecular Biology* 23(3):192-96. doi: 10.1038/nsmb.3181.
- Harz, H., K. Burgdorf, et J. V. Höltje. 1990. « Isolation and Separation of the Glycan Strands from Murein of *Escherichia Coli* by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography ». *Analytical Biochemistry* 190(1):120-28. doi: 10.1016/0003-2697(90)90144-x.
- Hassan, Susan, Vladimir E. Shevchik, Xavier Robert, et Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat. 2013. « PelN Is a New Pectate Lyase of *Dickeya Dadantii* with Unusual Characteristics ». *Journal of Bacteriology* 195(10):2197-2206. doi: 10.1128/JB.02118-12.
- Haurlyuk, Vasilii, Gemma C. Atkinson, Katsuhiko S. Murakami, Tanel Tenson, et Kenn Gerdes. 2015. « Recent Functional Insights into the Role of (p)ppGpp in Bacterial Physiology ». *Nature Reviews Microbiology* 13(5):298-309. doi: 10.1038/nrmicro3448.
- Hayhurst, Emma J., Lekshmi Kailas, Jamie K. Hobbs, et Simon J. Foster. 2008. « Cell Wall Peptidoglycan Architecture in *Bacillus Subtilis* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(38):14603-8. doi: 10.1073/pnas.0804138105.
- Hendrickx, Antoni P. A., Jonathan M. Budzik, So-Young Oh, et Olaf Schneewind. 2011. « Architects at the Bacterial Surface — Sortases and the Assembly of Pili with Isopeptide Bonds ». *Nature Reviews Microbiology* 9(3):166-76. doi: 10.1038/nrmicro2520.
- Henrissat, B., S. E. Heffron, M. D. Yoder, S. E. Lietzke, et F. Journak. 1995. « Functional Implications of Structure-Based Sequence Alignment of Proteins in the Extracellular Pectate Lyase Superfamily ». *Plant Physiology* 107(3):963-76. doi: 10.1104/pp.107.3.963.
- Herlihey, Francesca A., Patrick J. Moynihan, et Anthony J. Clarke. 2014. « The Essential Protein for Bacterial Flagella Formation FlgJ Functions as a β -N-Acetylglucosaminidase ». *Journal of Biological Chemistry* 289(45):31029-42. doi: 10.1074/jbc.M114.603944.
- Hermansen, Simen, Dirk Linke, et Jack C. Leo. 2022. « Transmembrane β -Barrel Proteins of Bacteria: From Structure to Function ». P. 113-61 in *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. Vol. 128. Elsevier.
- Hesse, Lars, Julieanne Bostock, Sebastien Dementin, Didier Blanot, Dominique Mengin-Lecreux, et Ian Chopra. 2003. « Functional and Biochemical Analysis of *Chlamydia Trachomatis* MurC, an Enzyme Displaying UDP-N-Acetylmuramate:Amino Acid Ligase Activity ». *Journal of Bacteriology* 185(22):6507-12. doi: 10.1128/JB.185.22.6507-6512.2003.
- Hirashima, Akikazu, Geoffrey Childs, et Masayori Inouye. 1973. « Differential Inhibitory Effects of Antibiotics on the Biosynthesis of Envelope Proteins of *Escherichia Coli* ». *Journal of Molecular Biology* 79(2):373-89. doi: 10.1016/0022-2836(73)90012-0.
- Hirota, Y., H. Suzuki, Y. Nishimura, et S. Yasuda. 1977. « On the Process of Cellular Division in *Escherichia Coli*: A Mutant of *E. Coli* Lacking a Murein-Lipoprotein. ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74(4):1417-20. doi: 10.1073/pnas.74.4.1417.
- Hoang, Hanh H., Nicholas N. Nickerson, Vincent T. Lee, Anastasia Kazimirova, Mohamed Chami, Anthony P. Pugsley, et Stephen Lory. 2011. « Outer Membrane Targeting of *Pseudomonas Aeruginosa* Proteins Shows Variable Dependence on the Components of Bam and Lol Machineries » édité par H. A. Shuman. *mBio* 2(6):e00246-11. doi: 10.1128/mBio.00246-11.
- Höltje, Joachim-Volker. 1998. « Growth of the Stress-Bearing and Shape-Maintaining Murein Sacculus of *Escherichia Coli* ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(1):181-203. doi: 10.1128/MMBR.62.1.181-203.1998.
- Höppner, Christoph, Anna Carle, Durga Sivanesan, Sabine Hoepfner, et Christian Baron. 2005. « The Putative Lytic Transglycosylase VirB1 from *Brucella Suis* Interacts with the Type IV Secretion System Core Components VirB8, VirB9 and VirB11 ». *Microbiology* 151(11):3469-82. doi: 10.1099/mic.0.28326-0.
- Horita, Yasuhiro, Shinji Maeda, Yuko Kazumi, et Norio Doi. 2014. « *In Vitro* Susceptibility of Mycobacterium Tuberculosis Isolates to an Oral Carbapenem Alone or in Combination with β -Lactamase Inhibitors ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58(11):7010-14. doi: 10.1128/AAC.03539-14.
- Horne, Jim E., David J. Brockwell, et Sheena E. Radford. 2020. « Role of the Lipid Bilayer in Outer Membrane Protein Folding in Gram-Negative Bacteria ». *Journal of Biological Chemistry* 295(30):10340-67. doi: 10.1074/jbc.REV120.011473.
- Hoshino, Otomatsu, Uri Zehavi, Pierre Sinaÿ, et Roger W. Jeanloz. 1972. « The Isolation and Structure Identification of a Disaccharide Containing Manno-Muramic Acid from *Micrococcus Lysodeikticus* Cell Wall ». *Journal of Biological Chemistry* 247(2):381-90. doi: 10.1016/S0021-9258(19)45715-3.
- Howard, S. Peter, Leandro F. Estrozi, Quentin Bertrand, Carlos Contreras-Martel, Timothy Strozen, Viviana Job, Alexandre Martins, Daphna Fenel, Guy Schoehn, et Andréa Dessen. 2019. « Structure and Assembly of Pilotin-Dependent and -Independent Secretins of the Type II Secretion System ». *PLoS Pathogens* 15(5):e1007731. doi: 10.1371/journal.ppat.1007731.
- Hsu, Pin-Chia, Firdaus Samsudin, Jonathan Shearer, et Syma Khalid. 2017. « It Is Complicated: Curvature, Diffusion, and Lipid Sorting within the Two Membranes of *Escherichia Coli* ». *The Journal of Physical Chemistry Letters* 8(22):5513-18. doi: 10.1021/acs.jpcllett.7b02432.

- Hugonneau-Beaufet, Inès, Jean-Philippe Barnier, Stanislas Thiriet-Rupert, Sylvie Létoffé, Jean-Luc Mainardi, Jean-Marc Ghigo, Christophe Beloin, et Michel Arthur. 2023. « Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* L,D-Transpeptidases and Evaluation of Their Role in Peptidoglycan Adaptation to Biofilm Growth ». *Microbiology Spectrum* 0(0):e05217-22. doi: 10.1128/spectrum.05217-22.
- Hugonnet, Jean-Emmanuel, Dominique Mengin-Lecreux, Alejandro Monton, Tanneke den Blaauwen, Etienne Carbonnelle, Carole Veckerlé, Yves Brun V., Michael van Nieuwenhze, Christiane Bouchier, Kuyek Tu, Louis B. Rice, et Michel Arthur. 2016. « Factors Essential for L,D-Transpeptidase-Mediated Peptidoglycan Cross-Linking and β -Lactam Resistance in *Escherichia Coli* ». *eLife* 5. doi: 10.7554/eLife.19469.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, Nicole, Cécile Jacot des-Combes, Jérôme Briolay, et Leighton Pritchard. 2021. « Proposal for the Creation of a New Genus *Musicola* Gen. Nov., Reclassification of *Dickeya Paradisiaca* (Samson et al. 2005) as *Musicola Paradisiaca* Comb. Nov. and Description of a New Species *Musicola Keenii* Sp. Nov. » *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 71(10). doi: 10.1099/ijsem.0.005037.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, Nicole, Guy Condemine, Erwan Gueguen, et Vladimir E. Shevchik. 2020. « *Dickeya* Plant Pathogens. » doi: 10.1002/9780470015902.a0028932.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, Nicole, Guy Condemine, et Vladimir E. Shevchik. 2014. « Bacterial Pectate Lyases, Structural and Functional Diversity: Bacterial Pectate Lyases ». *Environmental Microbiology Reports* 6(5):427-40. doi: 10.1111/1758-2229.12166.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, Nicole, Monique Royer, Erwan Gueguen, Paul Le Guen, Roderich D. Süssmuth, Sylvie Reverchon, et Stéphane Cociancich. 2022. « Specificity and Genetic Polymorphism in the Vfm Quorum Sensing System of Plant Pathogenic Bacteria of the Genus *Dickeya* ». *Environmental Microbiology* 24(3):1467-83. doi: 10.1111/1462-2920.15889.
- Hussein, Nahla A., Seung-Hyun Cho, Géraldine Laloux, Rania Siam, et Jean-François Collet. 2018. « Distinct Domains of *Escherichia Coli* IgaA Connect Envelope Stress Sensing and Down-Regulation of the Rcs Phosphorelay across Subcellular Compartments » édité par P. H. Viollier. *PLOS Genetics* 14(5):e1007398. doi: 10.1371/journal.pgen.1007398.
- Hwang Fu, Yu-Hsien, William Y. C. Huang, Kuang Shen, Jay T. Groves, Thomas Miller, et Shu-ou Shan. 2017. « Two-Step Membrane Binding by the Bacterial SRP Receptor Enable Efficient and Accurate Co-Translational Protein Targeting ». *eLife* 6:e25885. doi: 10.7554/eLife.25885.
- Itskanov, Samuel, et Eunyong Park. 2019. « Structure of the posttranslational Sec protein-translocation channel complex from yeast ». *Science (New York, N.Y.)* 363(6422):84-87. doi: 10.1126/science.aav6740.
- Jack, R. L., Sargent, F., Berks, B. C., Sawers, G., & Palmer, T. (2001). Constitutive Expression of *Escherichia coli* *tat* Genes Indicates an Important Role for the Twin-Arginine Translocase during Aerobic and Anaerobic Growth. *Journal of Bacteriology*, 183(5), 1801-1804. <https://doi.org/10.1128/JB.183.5.1801-1804.2001>
- Janda, J. Michael, et Sharon L. Abbott. 2021. « The Changing Face of the Family Enterobacteriaceae (Order: "Enterobacterales"): New Members, Taxonomic Issues, Geographic Expansion, and New Diseases and Disease Syndromes ». *Clinical Microbiology Reviews* 34(2):e00174-20. doi: 10.1128/CMR.00174-20.
- Jean, N., Bougault, C., & Simorre, J. P. (2022, octobre 4). Glycopédia. Consulté 4 octobre 2022, à l'adresse <http://www.glycopedia.eu/e-chapters/the-structure-of-bacterial-cell/article/peptidoglycan-molecular-structure>
- Jeske, Olga, Margarete Schöler, Peter Schumann, Alexander Schneider, Christian Boedeker, Mareike Jogler, Daniel Bollschweiler, Manfred Rohde, Christoph Mayer, Harald Engelhardt, Stefan Spring, et Christian Jogler. 2015. « Planctomycetes Do Possess a Peptidoglycan Cell Wall ». *Nature Communications* 6(1):7116. doi: 10.1038/ncomms8116.
- Jones, N. C., et M. J. Osborn. 1977. « Translocation of Phospholipids between the Outer and Inner Membranes of *Salmonella Typhimurium*. » *Journal of Biological Chemistry* 252(20):7405-12. doi: 10.1016/S0021-9258(19)66979-6.
- Jongbloed, Jan D. H., Ulrike Grieger, Haike Antelmann, Michael Hecker, Reindert Nijland, Sierd Bron, et Jan Maarten van Dijk. 2004. « Two Minimal Tat Translocases in *Bacillus* ». *Molecular Microbiology* 54(5):1319-25. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04341.x.
- Joris, Bernard, Serge Englebert, Chien-Peng Chu, Reiko Kariyama, Lolita Daneo-Moore, Gerald D. Shockman, et Jean-Marie Ghuysen. 1992. « Modular Design of the *Enterococcus Hirae* Muramidase-2 and *Streptococcus Faecalis* Autolysin ». *FEMS Microbiology Letters* 91(3):257-64. doi: 10.1111/j.1574-6968.1992.tb05218.x.
- Joseleau-Petit, D., J. C. Liebart, J. A. Ayala, et R. D'Ari. 2007. « Unstable *Escherichia Coli* L Forms Revisited: Growth Requires Peptidoglycan Synthesis ». *Journal of Bacteriology* 189(18):6512-20. doi: 10.1128/JB.00273-07.
- Jozwick, Anna K. S., Scott E. LaPatra, Joerg Graf, et Timothy J. Welch. 2019. « Flagellar Regulation Mediated by the Rcs Pathway Is Required for Virulence in the Fish Pathogen *Yersinia Ruckeri* ». *Fish & Shellfish Immunology* 91:306-14. doi: 10.1016/j.fsi.2019.05.036.
- Kamio, Y., et H. Nikaido. 1976. « Outer Membrane of *Salmonella Typhimurium*: Accessibility of Phospholipid Head Groups to Phospholipase c and Cyanogen Bromide Activated Dextran in the External Medium ». *Biochemistry* 15(12):2561-70. doi: 10.1021/bi00657a012.
- Kamischke, Cassandra, Junping Fan, Julien Bergeron, Hemantha D. Kulasekara, Zachary D. Dalebroux, Anika Burrell, Justin M. Kollman, et Samuel I. Miller. 2019. « The *Acinetobacter baumannii* Mla system and glycerophospholipid transport to the outer membrane » édité par W. S. Garrett et T. Mignot. *eLife* 8:e40171. doi: 10.7554/eLife.40171.
- Kang, Katie N., Misha I. Kazi, Jacob Biboy, Joe Gray, Hannah Bovermann, Jessie Ausman, Cara C. Boutte, Waldemar Vollmer, et Joseph M. Boll. 2021. « Septal Class A Penicillin-Binding Protein Activity and LD -Transpeptidases Mediate Selection of Colistin-Resistant Lipooligosaccharide-Deficient *Acinetobacter Baumannii* » édité par V. Sperandio. *mBio* 12(1):e02185-20. doi: 10.1128/mBio.02185-20.
- Kastelein, P., M. G. Förch, M. C. Krijger, P. S. Van Der Zouwen, W. Van Den Berg, et J. M. Van Der Wolf. 2021. « Systemic Colonization of Potato Plants Resulting from Potato Haulm Inoculation with *Dickeya Solani* or *Pectobacterium Parmentieri* ». *Canadian Journal of Plant Pathology* 43(1):1-15. doi: 10.1080/07060661.2020.1777465.
- Kaushik, Sharbani, Haoze He, et Ross E. Dalbey. 2022. « Bacterial Signal Peptides- Navigating the Journey of Proteins ». *Frontiers in Physiology* 13.
- Kazemi-Pour, Nasrin, Guy Condemine, et Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat. 2004. « The Secretome of the Plant Pathogenic Bacterium *Erwinia Chrysanthemi* ». *PROTEOMICS* 4(10):3177-86. doi: 10.1002/pmic.200300814.

- Keck, Matthias, Nicolas Gisch, Hermann Moll, Frank-Jörg Vorhölter, Klaus Gerth, Uwe Kahmann, Manfred Lissel, Buko Lindner, Karsten Niehaus, et Otto Holst. 2011. « Unusual Outer Membrane Lipid Composition of the Gram-Negative, Lipopolysaccharide-Lacking *Mycobacterium Sorangium Cellulosum* So Ce56 ». *Journal of Biological Chemistry* 286(15):12850-59. doi: 10.1074/jbc.M110.194209.
- Khursigara, Cezar M., Susan F. Koval, Dianne M. Moyles, et Robert J. Harris. 2018. « Inroads through the Bacterial Cell Envelope: Seeing Is Believing ». *Canadian Journal of Microbiology* 64(9):601-17. doi: 10.1139/cjm-2018-0091.
- Kieser, Karen J., et Eric J. Rubin. 2014. « How Sisters Grow Apart: Mycobacterial Growth and Division ». *Nature Reviews Microbiology* 12(8):550-62. doi: 10.1038/nrmicro3299.
- Kim, Hyunhee, Kevin Wu, et Changhan Lee. 2021. « Stress-Responsive Periplasmic Chaperones in Bacteria ». *Frontiers in Molecular Biosciences* 8.
- Kim, Sungjae, Inseok Song, Gaeul Eom, et Seokhee Kim. 2018. « A Small Periplasmic Protein with a Hydrophobic C-Terminal Residue Enhances DegP Proteolysis as a Suicide Activator ». *Journal of Bacteriology* 200(3):e00519-17. doi: 10.1128/JB.00519-17.
- Kleerebezem, M., W. Crielaard, et J. Tommassen. 1996. « Involvement of Stress Protein PspA (Phage Shock Protein A) of *Escherichia Coli* in Maintenance of the Protonmotive Force under Stress Conditions. » *The EMBO Journal* 15(1):162-71. doi: 10.1002/j.1460-2075.1996.tb00344.x.
- Kocaoglu, Ozden, et Erin E. Carlson. 2015. « Profiling of β -Lactam Selectivity for Penicillin-Binding Proteins in *Escherichia Coli* Strain DC2 ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59(5):2785-90. doi: 10.1128/AAC.04552-14.
- Koebnik, R., K. P. Locher, et P. Van Gelder. 2000. « Structure and Function of Bacterial Outer Membrane Proteins: Barrels in a Nutshell ». *Molecular Microbiology* 37(2):239-53. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01983.x.
- Kojima, Seiji, Kyong-Cheol Ko, Yumiko Takatsuka, Naoki Abe, Jun Kaneko, Yoshifumi Itoh, et Yoshiyuki Kamio. 2010. « Cadaverine Covalently Linked to Peptidoglycan Is Required for Interaction between the Peptidoglycan and the Periplasm-Exposed S-Layer-Homologous Domain of Major Outer Membrane Protein Mep45 in *Selenomonas Ruminantium* ». *Journal of Bacteriology* 192(22):5953-61. doi: 10.1128/JB.00417-10.
- Konovalova, Anna, David H. Perlman, Charles E. Cowles, et Thomas J. Silhavy. 2014. « Transmembrane Domain of Surface-Exposed Outer Membrane Lipoprotein RcsF Is Threaded through the Lumen of β -Barrel Proteins ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(41). doi: 10.1073/pnas.1417138111.
- Konovalova, Anna, et Thomas J. Silhavy. 2015. « Outer membrane lipoprotein biogenesis: Lol is not the end ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 370(1679):20150030. doi: 10.1098/rstb.2015.0030.
- Konovalova, A., Mitchell, A. M., & Silhavy, T. J. (2016). A lipoprotein/ β -barrel complex monitors lipopolysaccharide integrity transducing information across the outer membrane. *eLife*, 5, e15276. <https://doi.org/10.7554/eLife.15276>
- Koonin, Eugene V. 2010. « The Origin and Early Evolution of Eukaryotes in the Light of Phylogenomics ». *Genome Biology* 11(5):209. doi: 10.1186/gb-2010-11-5-209.
- Koraimann, G. 2003. « Lytic transglycosylases in macromolecular transport systems of Gram-negative bacteria ». *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 60(11):2371-88. doi: 10.1007/s00018-003-3056-1.
- Korotkov, Konstantin V., Els Pardon, Jan Steyaert, et Wim G. J. Hol. 2009. « Crystal Structure of the N-Terminal Domain of the Secretin GspD from ETEC Determined with the Assistance of a Nanobody ». *Structure* 17(2):255-65. doi: 10.1016/j.str.2008.11.011.
- Korotkov, Konstantin V., et Maria Sandkvist. 2019. « Architecture, Function, and Substrates of the Type II Secretion System » édité par E. Cascales et P. J. Christie. *EcoSal Plus* 8(2):ecosalplus.ESP-0034-2018. doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0034-2018.
- Korotkov, Konstantin V., Maria Sandkvist, et Wim G. J. Hol. 2012. « The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism ». *Nature reviews. Microbiology* 10(5):336-51. doi: 10.1038/nrmicro2762.
- Kraft, Angelika R., Julia Prabhu, Astrid Ursinus, et Joachim-Volker Höltje. 1999. « Interference with Murein Turnover Has No Effect on Growth but Reduces β -Lactamase Induction in *Escherichia coli* ». *Journal of Bacteriology* 181(23):7192-98. doi: 10.1128/jb.181.23.7192-7198.1999.
- Kröger, Carsten, Aoife Colgan, Shabarinath Srikumar, Kristian Händler, Sathesh K. Sivasankaran, Disa L. Hammarlöf, Rocío Canals, Joe E. Grissom, Tyrrell Conway, Karsten Hokamp, et Jay C. D. Hinton. 2013. « An Infection-Relevant Transcriptomic Compendium for *Salmonella Enterica* Serovar *Typhimurium* ». *Cell Host & Microbe* 14(6):683-95. doi: 10.1016/j.chom.2013.11.010.
- Krojer, Tobias, Justyna Sawa, Eva Schäfer, Helen R. Saibil, Michael Ehrmann, et Tim Clausen. 2008. « Structural Basis for the Regulated Protease and Chaperone Function of DegP ». *Nature* 453(7197):885-90. doi: 10.1038/nature07004.
- Kruger, Ryan G., Balint Otvos, Brenda A. Frankel, Matthew Bentley, Patrick Dostal, et Dewey G. McCafferty. 2004. « Analysis of the Substrate Specificity of the *Staphylococcus Aureus* Sortase Transpeptidase SrtA ». *Biochemistry* 43(6):1541-51. doi: 10.1021/bi035920j.
- von Kügelgen, Andriko, Sofie van Dorst, Vikram Alva, et Tanmay A. M. Bharat. 2022. « A Multidomain Connector Links the Outer Membrane and Cell Wall in Phylogenetically Deep-Branching Bacteria ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 119(33):e2203156119. doi: 10.1073/pnas.2203156119.
- Kulp, Adam, et Meta J. Kuehn. 2010. « Biological Functions and Biogenesis of Secreted Bacterial Outer Membrane Vesicles ». *Annual Review of Microbiology* 64(1):163-84. doi: 10.1146/annurev.micro.091208.073413.
- Kumar, Pankaj, Amit Kaushik, Evan P. Lloyd, Shao-Gang Li, Rohini Mattoo, Nicole C. Ammerman, Drew T. Bell, Alexander L. Perryman, Trevor A. Zandi, Sean Ekins, Stephan L. Ginell, Craig A. Townsend, Joel S. Freundlich, et Gyanu Lamichhane. 2017. « Non-Classical Transpeptidases Yield Insight into New Antibacterials ». *Nature Chemical Biology* 13(1):54-61. doi: 10.1038/nchembio.2237.
- Kumar, Pradeep, Kriti Arora, John R. Lloyd, III Y. Lee, Vinod Nair, Elizabeth Fischer, Helena I. M. Boshoff, et Clifton E. Barry III. 2012. « Meropenem Inhibits D,D-Carboxypeptidase Activity in *Mycobacterium Tuberculosis* ». *Molecular Microbiology* 86(2):367-81. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08199.x.
- Kumar, Pradeep, Madhu Kamle, Rituraj Borah, Dipendra Kumar Mahato, et Bharti Sharma. 2021. « *Bacillus Thuringiensis* as Microbial Biopesticide: Uses and Application for Sustainable Agriculture ». *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 31(1):95. doi: 10.1186/s41938-021-00440-3.

- Kumar, Santosh, et Anna Konovalova. 2023. « BAME Directly Interacts with BAMA and BAMD Coordinating Their Functions ». *Molecular Microbiology* 120(3):397-407. doi: 10.1111/mmi.15127.
- Kuroda, A., Asami, Y., & Sekiguchi, J. (1993). Molecular cloning of a sporulation-specific cell wall hydrolase gene of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 175(19), 6260-6268. <https://doi.org/10.1128/jb.175.19.6260-6268.1993>
- Kysela, David T., Amelia M. Randich, Paul D. Caccamo, et Yves V. Brun. 2016. « Diversity Takes Shape: Understanding the Mechanistic and Adaptive Basis of Bacterial Morphology ». *PLoS Biology* 14(10):e1002565. doi: 10.1371/journal.pbio.1002565.
- Laatu, Minna, et Guy Condemine. 2003. « Rhamnolacturonate Lyase RhlE Is Secreted by the Out System in *Erwinia Chrysanthemii* ». *Journal of Bacteriology* 185(5):1642-49. doi: 10.1128/JB.185.5.1642-1649.2003.
- Labischinski, H., E. W. Goodell, A. Goodell, et M. L. Hochberg. 1991. « Direct Proof of a “More-than-Single-Layered” Peptidoglycan Architecture of *Escherichia Coli* W7: A Neutron Small-Angle Scattering Study ». *Journal of Bacteriology* 173(2):751-56. doi: 10.1128/jb.173.2.751-756.1991.
- Lake, James A. 2009. « Evidence for an Early Prokaryotic Endosymbiosis ». *Nature* 460(7258):967-71. doi: 10.1038/nature08183.
- Lakshmikanth, Chikkamenahalli Lakshminarayana, Shancy Petsel Jacob, Avinash Kundadka Kudva, Calivarathan Latchoumycandane, Puttaraju Srikanta Murthy Yashaswini, Mosale Seetharam Sumanth, Cassiano F. Goncalves-de-Albuquerque, Adriana R. Silva, Sridevi Annapurna Singh, Hugo C. Castro-Faria-Neto, Sandeep Kumble Prabhu, Thomas M. McIntyre, et Gopal Kedihithlu Marathe. 2016. « *Escherichia Coli* Braun Lipoprotein (BLP) Exhibits Endotoxemia – like Pathology in Swiss Albino Mice ». *Scientific Reports* 6(1):34666. doi: 10.1038/srep34666.
- Laubacher, Mary E., et Sarah E. Ades. 2008. « The Rcs Phosphorelay Is a Cell Envelope Stress Response Activated by Peptidoglycan Stress and Contributes to Intrinsic Antibiotic Resistance ». *Journal of Bacteriology* 190(6):2065-74. doi: 10.1128/JB.01740-07.
- Lavollay, Marie, Michel Arthur, Martine Fourgeaud, Lionel Dubost, Arul Marie, Nicolas Veziris, Didier Blanot, Laurent Gutmann, et Jean-Luc Mainardi. 2008. « The Peptidoglycan of Stationary-Phase *Mycobacterium Tuberculosis* Predominantly Contains Cross-Links Generated by L,D-Transpeptidation ». *Journal of Bacteriology* 190(12):4360-66. doi: 10.1128/JB.00239-08.
- Lazzaroni, J. C., et R. C. Portalier. 1981. « Genetic and Biochemical Characterization of Periplasmic-Leaky Mutants of *Escherichia Coli* K-12 ». *Journal of Bacteriology* 145(3):1351-58. doi: 10.1128/jb.145.3.1351-1358.1981.
- Leaver, M., P. Domínguez-Cuevas, J. M. Coxhead, R. A. Daniel, et J. Errington. 2009. « Life without a Wall or Division Machine in *Bacillus Subtilis* ». *Nature* 457(7231):849-53. doi: 10.1038/nature07742.
- Lecoq, Lauriane, Vincent Dubée, Sébastien Triboulet, Catherine Bougault, Jean-Emmanuel Hugonnet, Michel Arthur, et Jean-Pierre Simorre. 2013. « The structure of *Enterococcus Faecium* L,D-transpeptidase acylated by ertapenem provides insight into the inactivation mechanism ». *ACS chemical biology* 8(6):1140-46. doi: 10.1021/cb4001603.
- Lee, Changhan, Patrick Betschinger, Kevin Wu, Dawid S. Żyła, Rudi Glockshuber, et James Ca Bardwell. 2020. « A Metabolite Binding Protein Moonlights as a Bile-responsive Chaperone ». *The EMBO Journal* 39(20):e104231. doi: 10.15252/embj.2019104231.
- Lee, Philip A., Danielle Tullman-Ercek, et George Georgiou. 2006. « The Bacterial Twin-Arginine Translocation Pathway ». *Annual review of microbiology* 60:373-95. doi: 10.1146/annurev.micro.60.080805.142212.
- Leighton, Tiffany L., Neha Dayalani, Liliana M. Sampaleanu, P. Lynne Howell, et Lori L. Burrows. 2015. « Novel Role for PilNO in Type IV Pilus Retraction Revealed by Alignment Subcomplex Mutations » édité par G. A. O’Toole. *Journal of Bacteriology* 197(13):2229-38. doi: 10.1128/JB.00220-15.
- Leive, Loretta. 1965. « Release of Lipopolysaccharide by EDTA Treatment of *E. Coli* ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 21(4):290-96. doi: 10.1016/0006-291X(65)90191-9.
- Léonard, Raphaël R., Eric Sauvage, Valérien Lupo, Amandine Perrin, Damien Sirjacobs, Paulette Charlier, Frédéric Kerff, et Denis Baurain. 2022. « Was the Last Bacterial Common Ancestor a Monoderm after All? » *Genes* 13(2):376. doi: 10.3390/genes13020376.
- Li, Gang, et S. Peter Howard. 2010. « ExeA Binds to Peptidoglycan and Forms a Multimer for Assembly of the Type II Secretion Apparatus in *Aeromonas Hydrophila*: ExeA Forms a Multimer on Peptidoglycan ». *Molecular Microbiology* 76(3):772-81. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07138.x.
- Li, Gene-Wei, David Burkhardt, Carol Gross, et Jonathan S. Weissman. 2014. « Quantifying Absolute Protein Synthesis Rates Reveals Principles Underlying Allocation of Cellular Resources ». *Cell* 157(3):624-35. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.033.
- Li, Haiming, Pierre-Étienne Jacques, Mariana Gabriela Ghinet, Ryszard Brzezinski, et Rolf Morosoli. 2005. « Determining the functionality of putative Tat-dependent signal peptides in *Streptomyces coelicolor* A3(2) by using two different reporter proteins ». *Microbiology* 151(7):2189-98. doi: 10.1099/mic.0.27893-0.
- Libreros-Zúñiga, Gerardo Andrés, Catharina Dos Santos Silva, Rafaela Salgado Ferreira, et Marcio Vinicius Bertacine Dias. 2019. « Structural Basis for the Interaction and Processing of β -Lactam Antibiotics by L,D -Transpeptidase 3 (Ldt_{M13}) from *Mycobacterium Tuberculosis* ». *ACS Infectious Diseases* 5(2):260-71. doi: 10.1021/acscinfecdis.8b00244.
- Liechti, G., E. Kuru, E. Hall, A. Kalinda, Y. V. Brun, M. VanNieuwenhze, et A. T. Maurelli. 2014. « A new metabolic cell wall labeling method reveals peptidoglycan in *Chlamydia trachomatis* ». *Nature* 506(7489):507-10. doi: 10.1038/nature12892.
- Liechti, George, Erkin Kuru, Mathanraj Packiam, Yen-Pang Hsu, Srinivas Tekkam, Edward Hall, Jonathan T. Rittichier, Michael VanNieuwenhze, Yves V. Brun, et Anthony T. Maurelli. 2016. « Pathogenic *Chlamydia* Lack a Classical Sacculus but Synthesize a Narrow, Mid-cell Peptidoglycan Ring, Regulated by MreB, for Cell Division ». *PLoS Pathogens* 12(5):e1005590. doi: 10.1371/journal.ppat.1005590.
- Liechti, George, Raghuvver Singh, Patricia L. Rossi, Miranda D. Gray, Nancy E. Adams, et Anthony T. Maurelli. 2018. « *Chlamydia trachomatis* dapF Encodes a Bifunctional Enzyme Capable of Both d-Glutamate Racemase and Diaminopimelate Epimerase Activities ». *mBio* 9(2):10.1128/mbio.00204-18. doi: 10.1128/mbio.00204-18.
- Liechti, George W. 2021. « Localized Peptidoglycan Biosynthesis in *Chlamydia trachomatis* Conforms to the Polarized Division and Cell Size Reduction Developmental Models ». *Frontiers in Microbiology* 12.
- Lima, Santiago, Monica S. Guo, Rachna Chaba, Carol A. Gross, et Robert T. Sauer. 2013. « Dual Molecular Signals Mediate the Bacterial Response to Outer-Membrane Stress ». *Science* 340(6134):837-41. doi: 10.1126/science.1235358.

- Lin, Ming-Feng, Yun-You Lin, Hui-Wen Yeh, et Chung-Yu Lan. 2014. « Role of the BaeSR two-component system in the regulation of *Acinetobacter baumannii* adeAB genes and its correlation with tigecycline susceptibility ». *BMC Microbiology* 14(1):119. doi: 10.1186/1471-2180-14-119.
- Lipinska, B., O. Fayet, L. Baird, et C. Georgopoulos. 1989. « Identification, Characterization, and Mapping of the *Escherichia Coli* htrA Gene, Whose Product Is Essential for Bacterial Growth Only at Elevated Temperatures ». *Journal of Bacteriology* 171(3):1574-84. doi: 10.1128/jb.171.3.1574-1584.1989.
- Liu, Jinjin, Fan Yin, Te Liu, Shaowen Li, Chen Tan, Lu Li, Rui Zhou, et Qi Huang. 2020. « The Tat System and Its Dependent Cell Division Proteins Are Critical for Virulence of Extra-Intestinal Pathogenic *Escherichia Coli* ». *Virulence* 11(1):1279-92. doi: 10.1080/21505594.2020.1817709.
- Liu, Lulu, Virginie Gueguen-Chaignon, Isabelle R. Gonçalves, Christine Rasclé, Martine Rigault, Alia Dellagi, Elise Loisel, Nathalie Poussereau, Agnès Rodrigue, Laurent Terradot, et Guy Condemine. 2019. « A Secreted Metal-Binding Protein Protects Necrotrophic Phytopathogens from Reactive Oxygen Species ». *Nature Communications* 10(1):4853. doi: 10.1038/s41467-019-12826-x.
- Liu, Teh-Yung, et Emil C. Gotschlich. 1967. « Muramic Acid Phosphate as a Component of the Mucopeptide of Gram-Positive Bacteria ». *Journal of Biological Chemistry* 242(3):471-76. doi: 10.1016/S0021-9258(18)96297-6.
- Lobritz, Michael A., Ian W. Andrews, Dana Braff, Caroline B. M. Porter, Arnaud Gutierrez, Yoshikazu Furuta, Louis B. G. Cortes, Thomas Ferrante, Sarah C. Bening, Felix Wong, Charley Gruber, Christopher W. Bakerlee, Guillaume Lambert, Graham C. Walker, Daniel J. Dwyer, et James J. Collins. 2022. « Increased Energy Demand from Anabolic-Catabolic Processes Drives β -Lactam Antibiotic Lethality ». *Cell Chemical Biology* 29(2):276-286.e4. doi: 10.1016/j.chembiol.2021.12.010.
- Lundstedt, Emily, Daniel Kahne, et Natividad Ruiz. 2021. « Assembly and Maintenance of Lipids at the Bacterial Outer Membrane ». *Chemical Reviews* 121(9):5098-5123. doi: 10.1021/acs.chemrev.0c00587.
- Lupoli, Tania J., Hirokazu Tsukamoto, Emma H. Doud, Tsung-Shing Andrew Wang, Suzanne Walker, et Daniel Kahne. 2011. « Transpeptidase-Mediated Incorporation of D -Amino Acids into Bacterial Peptidoglycan ». *Journal of the American Chemical Society* 133(28):10748-51. doi: 10.1021/ja2040656.
- Lycklama a Nijeholt, Jelger A., et Arnold J. M. Driessen. 2012. « The bacterial Sec-translocase: structure and mechanism ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367(1592):1016-28. doi: 10.1098/rstb.2011.0201.
- Lyu, Zhixin, Atsushi Yahashiri, Xinxing Yang, Joshua W. McCausland, Gabriela M. Kaus, Ryan McQuillen, David S. Weiss, et Jie Xiao. 2022. « FtsN Maintains Active Septal Cell Wall Synthesis by Forming a Processive Complex with the Septum-Specific Peptidoglycan Synthases in *E. Coli* ». *Nature Communications* 13(1):5751. doi: 10.1038/s41467-022-33404-8.
- Magnet, S., S. Bellais, L. Dubost, M. Fourgeaud, J. L. Mainardi, S. Petit-Frère, A. Marie, D. Mengin-Lecreulx, M. Arthur, et L. Gutmann. 2007. « Identification of the L,D-Transpeptidases Responsible for Attachment of the Braun Lipoprotein to *Escherichia Coli* Peptidoglycan ». *Journal of Bacteriology* 189(10):3927-31. doi: 10.1128/JB.00084-07.
- Magnet, S., L. Dubost, A. Marie, M. Arthur, et L. Gutmann. 2008. « Identification of the L,D-Transpeptidases for Peptidoglycan Cross-Linking in *Escherichia Coli* ». *Journal of Bacteriology* 190(13):4782-85. doi: 10.1128/JB.00025-08.
- Magnet, Sophie, Ana Arbeloa, Jean-Luc Mainardi, Jean-Emmanuel Hugonnet, Martine Fourgeaud, Lionel Dubost, Arul Marie, Vanessa Delfosse, Claudine Mayer, Louis B. Rice, et Michel Arthur. 2007. « Specificity of L,D-Transpeptidases from Gram-Positive Bacteria Producing Different Peptidoglycan Chemotypes ». *Journal of Biological Chemistry* 282(18):13151-59. doi: 10.1074/jbc.M610911200.
- Mainardi, Jean-Luc, Martine Fourgeaud, Jean-Emmanuel Hugonnet, Lionel Dubost, Jean-Paul Brouard, Jamal Ouazzani, Louis B. Rice, Laurent Gutmann, et Michel Arthur. 2005. « A Novel Peptidoglycan Cross-Linking Enzyme for a β -Lactam-Resistant Transpeptidation Pathway ». *Journal of Biological Chemistry* 280(46):38146-52. doi: 10.1074/jbc.M507384200.
- Mainardi, Jean-Luc, Véronique Morel, Martine Fourgeaud, Julie Cremniter, Didier Blanot, Raymond Legrand, Claude Fréhel, Michel Arthur, Jean van Heijenoort, et Laurent Gutmann. 2002. « Balance between Two Transpeptidation Mechanisms Determines the Expression of β -Lactam Resistance in *Enterococcus Faecium* ». *Journal of Biological Chemistry* 277(39):35801-7. doi: 10.1074/jbc.M204319200.
- Maire, Justin, Carole Vincent-Monégat, Séverine Balmand, Agnès Vallier, Mireille Hervé, Florent Masson, Nicolas Parisot, Aurélien Vigneron, Caroline Anselme, Jackie Perrin, Julien Orlans, Isabelle Rahioui, Pedro Da Silva, Marie-Odile Fauvarque, Dominique Mengin-Lecreulx, Anna Zaidman-Rémy, et Abdelaziz Heddi. 2019. « Weevil *Pgrp-Lb* Prevents Endosymbiont TCT Dissemination and Chronic Host Systemic Immune Activation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116(12):5623-32. doi: 10.1073/pnas.1821806116.
- Malinverni, Juliana C., et Thomas J. Silhavy. 2009. « An ABC Transport System That Maintains Lipid Asymmetry in the Gram-Negative Outer Membrane ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(19):8009-14. doi: 10.1073/pnas.0903229106.
- Mandela, Eric, Christopher J. Stubenrauch, David Ryoo, Hyea Hwang, Eli J. Cohen, Von L. Torres, Pankaj Deo, Chaille T. Webb, Cheng Huang, Ralf B. Schittenhelm, Morgan Beeby, Jc Gumbart, Trevor Lithgow, et Iain D. Hay. 2022. « Adaptation of the Periplasm to Maintain Spatial Constraints Essential for Cell Envelope Processes and Cell Viability ». *eLife* 11:e73516. doi: 10.7554/eLife.73516.
- Margolin, William. 2005. « FtsZ And The Division Of Prokaryotic Cells And Organelles ». *Nature reviews. Molecular cell biology* 6(11):862-71. doi: 10.1038/nrm1745.
- Markovski, Monica, Jessica L. Bohrhunter, Tania J. Lupoli, Tsuyoshi Uehara, Suzanne Walker, Daniel E. Kahne, et Thomas G. Bernhardt. 2016. « Cofactor Bypass Variants Reveal a Conformational Control Mechanism Governing Cell Wall Polymerase Activity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113(17):4788-93. doi: 10.1073/pnas.1524538113.
- Marienfeld, S., Uhlemann, E.-M., Schmid, R., Krämer, R., & Burkovski, A. (1997). Ultrastructure of the *Corynebacterium glutamicum* cell wall. *Antonie van Leeuwenhoek*, 72(4), 291-297. <https://doi.org/10.1023/A:1000578811089>
- Marraffini, Luciano A., et Olaf Schneewind. 2006. « Targeting Proteins to the Cell Wall of Sporulating *Bacillus Anthracis* ». *Molecular Microbiology* 62(5):1402-17. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05469.x.

- Marraffini, Luciano A., et Olaf Schneewind. 2007. « Sortase C-Mediated Anchoring of BasI to the Cell Wall Envelope of *Bacillus Anthracis* ». *Journal of Bacteriology* 189(17):6425-36. doi: 10.1128/JB.00702-07.
- Marrakchi, Hedia, Marie-Antoinette Lanéelle, et Mamadou Daffé. 2014. « Mycolic Acids: Structures, Biosynthesis, and Beyond ». *Chemistry & Biology* 21(1):67-85. doi: 10.1016/j.chembiol.2013.11.011.
- Martynowski, Dariusz, Pawel Grochulski, et Peter S. Howard. 2013. « Structure of a periplasmic domain of the EpsAB fusion protein of the *Vibrio vulnificus* type II secretion system ». *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 69(2):142-49. doi: 10.1107/S0907444912042710.
- Masilamani, Revathi, Melina B. Cian, et Zachary D. Dalebroux. 2018. « *Salmonella* Tol-Pal Reduces Outer Membrane Glycerophospholipid Levels for Envelope Homeostasis and Survival during Bacteremia » édité par M. Raffatellu. *Infection and Immunity* 86(7):e00173-18. doi: 10.1128/IAI.00173-18.
- Mates, Aaron K., Atef K. Sayed, et John W. Foster. 2007. « Products of the *Escherichia Coli* Acid Fitness Island Attenuate Metabolite Stress at Extremely Low pH and Mediate a Cell Density-Dependent Acid Resistance ». *Journal of Bacteriology* 189(7):2759-68. doi: 10.1128/JB.01490-06.
- Mathélié-Guinlet, Marion, Abir T. Asmar, Jean-François Collet, et Yves F. Dufrière. 2020. « Lipoprotein Lpp Regulates the Mechanical Properties of the *E. Coli* Cell Envelope ». *Nature Communications* 11(1):1789. doi: 10.1038/s41467-020-15489-1.
- Matias, V. R. F., Al-Amoudi, A., Dubochet, J., & Beveridge, T. J. (2003). Cryo-transmission electron microscopy of frozen-hydrated sections of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 185(20), 6112-6118. <https://doi.org/10.1128/JB.185.20.6112-6118.2003>
- Matias, Valério R. F., et Terry J. Beveridge. 2005. « Cryo-Electron Microscopy Reveals Native Polymeric Cell Wall Structure in *Bacillus Subtilis* 168 and the Existence of a Periplasmic Space ». *Molecular Microbiology* 56(1):240-51. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04535.x.
- Matias, Valério R. F., et Terry J. Beveridge. 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):1011-21. doi: 10.1128/JB.188.3.1011-1021.2006.
- Matilla, Miguel A., Rita E. Monson, et George P. C. Salmond. 2023. « *Dickeya Solani* ». *Trends in Microbiology* 31(10):1085-86. doi: 10.1016/j.tim.2023.03.003.
- Maya-Martinez, Roberto, J. Andrew N. Alexander, Christian F. Otten, Isabel Ayala, Daniela Vollmer, Joe Gray, Catherine M. Bougault, Alister Burt, Cédric Laguri, Matthieu Fonvielle, Michel Arthur, Natalie C. J. Strynadka, Waldemar Vollmer, et Jean-Pierre Simorre. 2019. « Recognition of Peptidoglycan Fragments by the Transpeptidase PBP4 From *Staphylococcus aureus* ». *Frontiers in Microbiology* 9:3223. doi: 10.3389/fmicb.2018.03223.
- Mazmanian, Sarkis K., Hung Ton-That, Kenneth Su, et Olaf Schneewind. 2002. « An Iron-Regulated Sortase Anchors a Class of Surface Protein during *Staphylococcus Aureus* Pathogenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(4):2293-98. doi: 10.1073/pnas.032523999.
- Meeske, Alexander J., Eammon P. Riley, William P. Robins, Tsuyoshi Uehara, John J. Mekalanos, Daniel Kahne, Suzanne Walker, Andrew C. Kruse, Thomas G. Bernhardt, et David Z. Rudner. 2016. « SEDS Proteins Are a Widespread Family of Bacterial Cell Wall Polymerases ». *Nature* 537(7622):634-38. doi: 10.1038/nature19331.
- Megrian, Daniela, Najwa Taib, Jerzy Witwinowski, Christophe Beloin, et Simonetta Gribaldo. 2020. « One or Two Membranes? Diderm Firmicutes Challenge the Gram-positive/Gram-negative Divide ». *Molecular Microbiology* 113(3):659-71. doi: 10.1111/mmi.14469.
- Mesnage, Stéphane, Mariano Dellarole, Nicola J. Baxter, Jean-Baptiste Rouget, Jordan D. Dimitrov, Ning Wang, Yukari Fujimoto, Andrea M. Hounslow, Sébastien Lacroix-Desmazes, Koichi Fukase, Simon J. Foster, et Michael P. Williamson. 2014. « Molecular Basis for Bacterial Peptidoglycan Recognition by LysM Domains ». *Nature Communications* 5(1):4269. doi: 10.1038/ncomms5269.
- Miller, Samuel I. 2016. « Antibiotic Resistance and Regulation of the Gram-Negative Bacterial Outer Membrane Barrier by Host Innate Immune Molecules ». *mBio* 7(5):e01541-16. doi: 10.1128/mBio.01541-16.
- Miller, Samuel I., et Nina R. Salama. 2018. « The Gram-Negative Bacterial Periplasm: Size Matters ». *PLOS Biology* 16(1):e2004935. doi: 10.1371/journal.pbio.2004935.
- Minabe, Masato, Kayo Takeuchi, Hidefumi Kumada, et Toshio Umemoto. 1994. « The Effect of Root Conditioning With Minocycline HCl in Removing Endotoxin From the Roots of Periodontally-Involved Teeth ». *Journal of Periodontology* 65(5):387-92. doi: 10.1902/jop.1994.65.5.387.
- Mitchell, Angela M., et Thomas J. Silhavy. 2019. « Envelope Stress Responses: Balancing Damage Repair and Toxicity ». *Nature Reviews Microbiology* 17(7):417-28. doi: 10.1038/s41579-019-0199-0.
- Molik, Sabine, Ivan Karnauchov, Constanze Weidlich, Reinhold G. Herrmann, et Ralf Bernd Klösgen. 2001. « The Rieske Fe/S Protein of the Cytochrome b₆/f Complex in Chloroplasts: Missing Link In The Evolution Of Protein Transport Pathways In Chloroplasts? » *Journal of Biological Chemistry* 276(46):42761-66.
- Molinari, G., S. R. Talay, P. Valentin-Weigand, M. Rohde, et G. S. Chhatwal. 1997. « The fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*, SfbI, is involved in the internalization of group A streptococci by epithelial cells. » *Infection and Immunity* 65(4):1357-63.
- Montón Silva, Alejandro, Christian Otten, Jacob Biboy, Eefjan Breukink, Michael VanNieuwenhze, Waldemar Vollmer, et Tanneke Den Blaauwen. 2018. « The Fluorescent D-Amino Acid NADA as a Tool to Study the Conditional Activity of Transpeptidases in *Escherichia coli* ». *Frontiers in Microbiology* 9:2101. doi: 10.3389/fmicb.2018.02101.
- Morè, Niccolò, Alessandra M. Martorana, Jacob Biboy, Christian Otten, Matthias Winkle, Carlos K. Gurnani Serrano, Alejandro Montón Silva, Lisa Atkinson, Hamish Yau, Eefjan Breukink, Tanneke den Blaauwen, Waldemar Vollmer, et Alessandra Polissi. 2019. « Peptidoglycan Remodeling Enables *Escherichia Coli* To Survive Severe Outer Membrane Assembly Defect » édité par K. A. Kline. *mBio* 10(1):e02729-18, /mbio/10/1/mBio.02729-18.atom. doi: 10.1128/mBio.02729-18.

- Morlot, Cécile, Lucile Pernot, Audrey Le Gouellec, Anne Marie Di Guilmi, Thierry Vernet, Otto Dideberg, et Andréa Dessen. 2005. « Crystal Structure of a Peptidoglycan Synthesis Regulatory Factor (PBP3) from *Streptococcus Pneumoniae* ». *Journal of Biological Chemistry* 280(16):15984-91. doi: 10.1074/jbc.M408446200.
- Mot, René, et Jos Vanderleyden. 1994. « The C-Terminal Sequence Conservation between OmpA-Related Outer Membrane Proteins and MotB Suggests a Common Function in Both Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria, Possibly in the Interaction of These Domains with Peptidoglycan ». *Molecular Microbiology* 12(2):333-34. doi: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb01021.x.
- Mueller, Elizabeth A., et Petra Anne Levin. 2020. « Bacterial Cell Wall Quality Control during Environmental Stress ». *mBio*. doi: 10.1128/mBio.02456-20.
- Mühlradt, P. F., J. Menzel, J. R. Golecki, et V. Speth. 1974. « Lateral Mobility and Surface Density of Lipopolysaccharide in the Outer Membrane of *Salmonella Typhimurium* ». *European Journal of Biochemistry* 43(3):533-39. doi: 10.1111/j.1432-1033.1974.tb03440.x.
- Mullineaux, Conrad W., Anja Nenninger, Nicola Ray, et Colin Robinson. 2006. « Diffusion of Green Fluorescent Protein in Three Cell Environments in *Escherichia Coli* ». *Journal of Bacteriology* 188(10):3442-48. doi: 10.1128/JB.188.10.3442-3448.2006.
- Nallamotu, Krishna Chaitanya, Raj Bahadur, Moneca Kaul, et Manjula Reddy. 2023. « Peptidoglycan Remodeling by an L,D-Transpeptidase, LdtD during Cold Shock in *Escherichia Coli* » édité par C. W. Mullineaux. *Journal of Bacteriology* 205(1):e00382-22. doi: 10.1128/jb.00382-22.
- Nambu, Takayuki, Tohru Minamino, Robert M. Macnab, et Kazuhiro Kutsukake. 1999. « Peptidoglycan-Hydrolyzing Activity of the FlgJ Protein, Essential for Flagellar Rod Formation in *Salmonella Typhimurium* ». *Journal of Bacteriology* 181(5):1555-61. doi: 10.1128/JB.181.5.1555-1561.1999.
- Nasser, William, Corinne Dorel, Julien Wawrzyniak, Frédérique Van Gijsegem, Marie-Christine Groleau, Eric Déziel, et Sylvie Reverchon. 2013. « Vfm a New Quorum Sensing System Controls the Virulence of *Dickeya Dadantii*: New Quorum Sensing Signal in *Dickeya* ». *Environmental Microbiology* 15(3):865-80. doi: 10.1111/1462-2920.12049.
- Natale, P., Brüser, T., & Driessen, A. J. M. (2008). Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane—Distinct translocases and mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(9), 1735-1756. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.015>
- Nelson, David E., et Kevin D. Young. 2000. « Penicillin Binding Protein 5 Affects Cell Diameter, Contour, and Morphology of *Escherichia Coli* ». *Journal of Bacteriology* 182(6):1714-21. doi: 10.1128/JB.182.6.1714-1721.2000.
- Nichols, Robert J., Saunak Sen, Yoe Jin Choo, Pedro Beltrao, Matylda Zietek, Rachna Chaba, Sueyoung Lee, Krystyna M. Kazmierczak, Karis J. Lee, Angela Wong, Michael Shales, Susan Lovett, Malcolm E. Winkler, Nevan J. Krogan, Athanasios Typas, et Carol A. Gross. 2011. « Phenotypic Landscape of a Bacterial Cell ». *Cell* 144(1):143-56. doi: 10.1016/j.cell.2010.11.052.
- Nicholson, Kathleen R., et Patricia A. Champion. 2022. « Bacterial Secretion Systems: Networks of Pathogenic Regulation and Adaptation in *Mycobacteria* and Beyond » édité par K. Kline. *PLOS Pathogens* 18(7):e1010610. doi: 10.1371/journal.ppat.1010610.
- Nickerson, Nicholas N., Christine C. Jao, Yiming Xu, John Quinn, Elizabeth Skippington, Mary Kate Alexander, Anh Miu, Nicholas Skelton, Jessica V. Hankins, Michael S. Lopez, Christopher M. Koth, Steven Rutherford, et Mireille Nishiyama. 2018. « A Novel Inhibitor of the LolCDE ABC Transporter Essential for Lipoprotein Trafficking in Gram-Negative Bacteria ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62(4):e02151-17. doi: 10.1128/AAC.02151-17.
- Nikaido, H., et M. Vaara. 1985. « Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability ». *Microbiological Reviews* 49(1):1-32. doi: 10.1128/mr.49.1.1-32.1985.
- Nikaido, Hiroshi. 2003. « Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 67(4):593-656. doi: 10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003.
- Nishida, Hiromi. 2020. « Factors That Affect the Enlargement of Bacterial Protoplasts and Spheroplasts ». *International Journal of Molecular Sciences* 21(19):7131. doi: 10.3390/ijms21197131.
- Nishida, Hiromi. 2023. « Approaches for Introducing Large DNA Molecules into Bacterial Cells ». *Journal of Applied Microbiology* 134(4):lxad059. doi: 10.1093/jambio/lxad059.
- Nishino, Kunihiro, Takeshi Honda, et Akihito Yamaguchi. 2005. « Genome-Wide Analyses of *Escherichia Coli* Gene Expression Responsive to the BaeSR Two-Component Regulatory System ». *Journal of Bacteriology* 187(5):1763-72. doi: 10.1128/JB.187.5.1763-1772.2005.
- Nivaskumar, Mangayarkarasi, et Olivera Francetic. 2014. « Type II Secretion System: A Magic Beanstalk or a Protein Escalator ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1843(8):1568-77. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.12.020.
- Noinaj, Nicholas, James C. Gumbart, et Susan K. Buchanan. 2017. « The β -Barrel Assembly Machinery in Motion ». *Nature Reviews Microbiology* 15(4):197-204. doi: 10.1038/nrmicro.2016.191.
- Nomura, M., et C. Witten. 1967. « Interaction of Colicins with Bacterial Cells III. Colicin-Tolerant Mutations in *Escherichia Coli* ». *Journal of Bacteriology* 94(4):1093-1111. doi: 10.1128/jb.94.4.1093-1111.1967.
- Ogawara, Hiroshi. 2015. « Penicillin-Binding Proteins in Actinobacteria ». *The Journal of Antibiotics* 68(4):223-45. doi: 10.1038/ja.2014.148.
- Ogoshi, C., F. P. Monteiro, W. F. Becker, M. V. Kvitschal, Y. F. Cardoza, J. G. Zanin, et V. Duarte. 2019. « First Report of *Dickeya dadantii* Causing a New Disease of Apple Trees in Brazil ». *New Disease Reports* 39(1):8-8. doi: 10.5197/j.2044-0588.2019.039.008.
- Ohno, N., T. Yadomae, et T. Miyazaki. 1982. « Identification of 2-Amino-2-Deoxyglucose Residues in the Peptidoglycan of *Streptococcus pneumoniae* ». *Carbohydrate Research* 107(1):152-55. doi: 10.1016/s0008-6215(00)80785-5.
- Oku, Yusuke, Kenji Kurokawa, Miki Matsuo, Sakuo Yamada, Bok-Luel Lee, et Kazuhisa Sekimizu. 2009. « Pleiotropic Roles of Polyglycerolphosphate Synthase of Lipoteichoic Acid in Growth of *Staphylococcus aureus* Cells ». *Journal of Bacteriology* 191(1):141-51. doi: 10.1128/JB.01221-08.
- Oldewurtel, Enno R., Yuki Kitahara, Baptiste Cordier, Richard Wheeler, Gizem Özbaykal, Elisa Brambilla, Ivo Gomperts Boneca, Lars D. Renner, et Sven Van Teeffelen. 2023. « Cell Envelope Growth of Gram-negative Bacteria Proceeds Independently of Cell Wall Synthesis ». *The EMBO Journal* e112168. doi: 10.15252/embj.2022112168.

- Osborne, Andrew R., Tom A. Rapoport, et Bert van den Berg. 2005. « Protein translocation by the Sec61/SecY channel ». *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21:529-50.
- Pallen, Mark J., et Brendan W. Wren. 1997. « The HtrA Family of Serine Proteases ». *Molecular Microbiology* 26(2):209-21. doi: 10.1046/j.1365-2958.1997.5601928.x.
- Palmer, Tracy, Alexander J. Finney, Chayan Kumar Saha, Gemma C. Atkinson, et Frank Sargent. 2021. « A Holin/Peptidoglycan Hydrolase-Dependent Protein Secretion System ». *Molecular Microbiology* 115(3):345-55. doi: 10.1111/mmi.14599.
- Park, Jeong Soon, Woo Cheol Lee, Kwon Joo Yeo, Kyoung-Seok Ryu, Malika Kumarasiri, Dusan Heseck, Mijoon Lee, Shahriar Mobashery, Jung Hyun Song, Seung Il Kim, Je Chul Lee, Chaejoon Cheong, Young Ho Jeon, et Hye-Yeon Kim. 2012. « Mechanism of Anchoring of OmpA Protein to the Cell Wall Peptidoglycan of the Gram-negative Bacterial Outer Membrane ». *The FASEB Journal* 26(1):219-28. doi: 10.1096/fj.11-188425.
- Park, Sohee, et Hongbaek Cho. 2022. « The Tol-Pal System Plays an Important Role in Maintaining Cell Integrity During Elongation in *Escherichia coli* ». *Frontiers in Microbiology* 13.
- Parsons, Lisa M., Florence Lin, et John Orban. 2006. « Peptidoglycan Recognition by Pal, an Outer Membrane Lipoprotein ». *Biochemistry* 45(7):2122-28. doi: 10.1021/bi052227i.
- Pasquina-Lemonche, L., J. Burns, R. D. Turner, S. Kumar, R. Tank, N. Mullin, J. S. Wilson, B. Chakrabarti, P. A. Bullough, S. J. Foster, et J. K. Hobbs. 2020. « The Architecture of the Gram Positive Bacterial Cell Wall ». *Nature* 582(7811):294-97. doi: 10.1038/s41586-020-2236-6.
- Patel, Ankur V., Robert D. Turner, Aline Rifflet, Adelina E. Acosta-Martin, Andrew Nichols, Milena M. Awad, Dena Lyras, Ivo Gomperts Boneca, Marshall Bern, Mark O. Collins, et Stéphane Mesnage. 2021. « PGFinder, a novel analysis pipeline for the consistent, reproducible, and high-resolution structural analysis of bacterial peptidoglycans » édité par M. Blokesch, G. Storz, S. Chou, et A. Clarke. *eLife* 10:e70597. doi: 10.7554/eLife.70597.
- Paul, T. R., & Beveridge, T. J. (1992). Reevaluation of envelope profiles and cytoplasmic ultrastructure of mycobacteria processed by conventional embedding and freeze-substitution protocols. *Journal of Bacteriology*, 174(20), 6508-6517. <https://doi.org/10.1128/jb.174.20.6508-6517.1992>
- Paulowski, Laura, Annemarie Donoghue, Christian Nehls, Sabrina Groth, Max Koistinen, Sven O. Hagge, Arne Böhling, Mathias Winterhalter, et Thomas Gutschmann. 2020. « The Beauty of Asymmetric Membranes: Reconstitution of the Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8:586. doi: 10.3389/fcell.2020.00586.
- de Pedro, Miguel A., et Felipe Cava. 2015. « Structural Constraints and Dynamics of Bacterial Cell Wall Architecture ». *Frontiers in Microbiology* 6. doi: 10.3389/fmicb.2015.00449.
- Peltier, Johann, Pascal Courtin, Imane El Meouche, Ludovic Lemée, Marie-Pierre Chapot-Chartier, et Jean-Louis Pons. 2011. « Clostridium Difficile Has an Original Peptidoglycan Structure with a High Level of N-Acetylglucosamine Deacetylation and Mainly 3-3 Cross-Links ». *Journal of Biological Chemistry* 286(33):29053-62. doi: 10.1074/jbc.M111.259150.
- Peters, Katharina, Suresh Kannan, Vincenzo A. Rao, Jacob Biboy, Daniela Vollmer, Stephen W. Erickson, Richard J. Lewis, Kevin D. Young, et Waldemar Vollmer. 2016. « The Redundancy of Peptidoglycan Carboxypeptidases Ensures Robust Cell Shape Maintenance in *Escherichia coli* » édité par O. Schneewind. *mBio* 7(3):e00819-16. doi: 10.1128/mBio.00819-16.
- Peters, Katharina, Manuel Pazos, Zainab Edo, Jean-Emmanuel Hugonnet, Alessandra M. Martorana, Alessandra Polissi, Michael S. VanNieuwenhze, Michel Arthur, et Waldemar Vollmer. 2018. « Copper Inhibits Peptidoglycan L,D-Transpeptidases Suppressing β -Lactam Resistance Due to Bypass of Penicillin-Binding Proteins ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115(42):10786-91. doi: 10.1073/pnas.1809285115.
- Peters, Katharina, Manuel Pazos, Michael VanNieuwenhze, et Waldemar Vollmer. 2019. « Optimized Protocol for the Incorporation of FDAA (HADA Labeling) for in Situ Labeling of Peptidoglycan ». *BIO-PROTOCOL* 9(15). doi: 10.21769/BioProtoc.3316.
- Pfeffer, John M., Hendrik Strating, Joel T. Weadge, et Anthony J. Clarke. 2006. « Peptidoglycan O Acetylation and Autolysin Profile of *Enterococcus faecalis* in the Viable but Nonculturable State ». *Journal of Bacteriology* 188(3):902-8. doi: 10.1128/JB.188.3.902-908.2006.
- Pidgeon, Sean E., Alexis J. Apostolos, Julia M. Nelson, Moagi Shaku, Binayak Rimal, M. Nurul Islam, Dean C. Crick, Sung Joon Kim, Martin S. Pavelka, Baves D. Kana, et Marcos M. Pires. 2019. « L,D-Transpeptidase Specific Probe Reveals Spatial Activity of Peptidoglycan Cross-Linking ». *ACS Chemical Biology* acschembio.9b00427. doi: 10.1021/acscchembio.9b00427.
- Pilhofer, Martin, Karin Aistleitner, Jacob Biboy, Joe Gray, Erkin Kuru, Edward Hall, Yves V. Brun, Michael S. VanNieuwenhze, Waldemar Vollmer, Matthias Horn, et Grant J. Jensen. 2013. « Discovery of Chlamydial Peptidoglycan Reveals Bacteria with Murein Sacculi but without FtsZ ». *Nature Communications* 4:2856. doi: 10.1038/ncomms3856.
- Pineau, Camille, Natalia Guschinskaya, Isabelle R. Gonçalves, Florence Ruaudel, Xavier Robert, Patrice Gouet, Lionel Ballut, et Vladimir E. Shevchik. 2021. « Structure–Function Analysis of Pectate Lyase Pel3 Reveals Essential Facets of Protein Recognition by the Bacterial Type 2 Secretion System ». *Journal of Biological Chemistry* 296:100305. doi: 10.1016/j.jbc.2021.100305.
- Pineau, Camille, Natalia Guschinskaya, Xavier Robert, Patrice Gouet, Lionel Ballut, et Vladimir E. Shevchik. 2014. « Substrate Recognition by the Bacterial Type II Secretion System: More than a Simple Interaction: Substrate Recognition by Type II Secretion System ». *Molecular Microbiology* 94(1):126-40. doi: 10.1111/mmi.12744.
- Poehlein, Anja, Gerhard Gottschalk, et Rolf Daniel. 2013. « First Insights into the Genome of the Gram-Negative, Endospore-Forming Organism *Sporomusa ovata* Strain H1 DSM 2662 ». *Genome Announcements* 1(5):10.1128/genomea.00734-13. doi: 10.1128/genomea.00734-13.
- Pogliano, Joe, Jian Ming Dong, Peter De Wulf, Dierdre Furlong, Dana Boyd, Richard Losick, Kit Pogliano, et E. C. C. Lin. 1998. « Aberrant Cell Division and Random FtsZ Ring Positioning in *Escherichia coli* *cpxA* * Mutants ». *Journal of Bacteriology* 180(13):3486-90. doi: 10.1128/JB.180.13.3486-3490.1998.
- Pokhrel, Rudramani, Rojesh Shakya, Prabin Baral, et Prem Chapagain. 2022. « Molecular Modeling and Simulation of the Peptidoglycan Layer of Gram-Positive Bacteria *Staphylococcus aureus* ». *Journal of Chemical Information and Modeling* 62(20):4955-62. doi: 10.1021/acs.jcim.2c00437.

- Popham, D L, J. Helin, C. E. Costello, et P. Setlow. 1996. « Analysis of the peptidoglycan structure of *Bacillus subtilis* endospores. » *Journal of Bacteriology* 178(22):6451-58.
- Popham, D. L., J. Helin, C. E. Costello, et P. Setlow. 1996. « Muramic Lactam in Peptidoglycan of *Bacillus Subtilis* Spores Is Required for Spore Outgrowth but Not for Spore Dehydration or Heat Resistance ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(26):15405-10. doi: 10.1073/pnas.93.26.15405.
- Popham, David L., et Casey B. Bernhards. 2015. « Spore Peptidoglycan » édité par P. Eichenberger et A. Driks. *Microbiology Spectrum* 3(6):3.6.10. doi: 10.1128/microbiolspec.TBS-0005-2012.
- Porfírio, Sara, Russell W. Carlson, et Parastoo Azadi. 2019. « Elucidating Peptidoglycan Structure: An Analytical Toolset ». *Trends in Microbiology* 27(7):607-22. doi: 10.1016/j.tim.2019.01.009.
- Potrykus, Marta, Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat, et Ewa Lojowska. 2018. « Interplay of Classic Exp and Specific Vfm Quorum Sensing Systems on the Phenotypic Features of *Dickeya Solani* Strains Exhibiting Different Virulence Levels: Vfm and Exp QS in *D. Solani* ». *Molecular Plant Pathology* 19(5):1238-51. doi: 10.1111/mpp.12614.
- Pratt, R. F. 2008. « Substrate Specificity of Bacterial DD-Peptidases (Penicillin-Binding Proteins) ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 65(14):2138-55. doi: 10.1007/s00018-008-7591-7.
- Priyadarshini, Richa, David L. Popham, et Kevin D. Young. 2006. « Daughter Cell Separation by Penicillin-Binding Proteins and Peptidoglycan Amidases in *Escherichia coli* ». *Journal of Bacteriology* 188(15):5345-55. doi: 10.1128/jb.00476-06.
- Pugsley, A. P. 1993. « The Complete General Secretory Pathway in Gram-Negative Bacteria ». *Microbiological Reviews* 57(1):50-108. doi: 10.1128/mr.57.1.50-108.1993.
- Py, Béatrice, Laurent Loiseau, et Frédéric Barras. 1999. « Assembly of the Type II Secretion Machinery of *Erwinia Chrysanthemi*: Direct Interaction and Associated Conformational Change between OutE, the Putative ATP-Binding Component and the Membrane Protein OutL ». *Journal of Molecular Biology* 289(3):659-70. doi: 10.1006/jmbi.1999.2803.
- Py, Béatrice, Laurent Loiseau, et Frédéric Barras. 2001. « An Inner Membrane Platform in the Type II Secretion Machinery of Gram-negative Bacteria ». *EMBO Reports* 2(3):244-48. doi: 10.1093/embo-reports/kve042.
- Quan, Shu, Philipp Koldewey, Tim Tapley, Nadine Kirsch, Karen M. Ruane, Jennifer Pfizenmaier, Rong Shi, Stephan Hofmann, Linda Foit, Guoping Ren, Ursula Jakob, Zhaohui Xu, Mirosław Cygler, et James C. A. Bardwell. 2011. « Genetic Selection Designed to Stabilize Proteins Uncovers a Chaperone Called Spy ». *Nature Structural & Molecular Biology* 18(3):262-69. doi: 10.1038/nsmb.2016.
- Quintela, J. C., M. Caparrós, et M. A. de Pedro. 1995. « Variability of Peptidoglycan Structural Parameters in Gram-Negative Bacteria ». *FEMS Microbiology Letters* 125(1):95-100. doi: 10.1111/j.1574-6968.1995.tb07341.x.
- Raetz, Christian R. H., Ziqiang Guan, Brian O. Ingram, David A. Six, Feng Song, Xiaoyuan Wang, et Jinshi Zhao. 2009. « Discovery of New Biosynthetic Pathways: The Lipid A Story ». *Journal of Lipid Research* 50:S103-8. doi: 10.1194/jlr.R800060-JLR200.
- Raetz, Christian R. H., et Chris Whitfield. 2002. « Lipopolysaccharide Endotoxins ». *Annual Review of Biochemistry* 71(1):635-700. doi: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414.
- Raffa, Robert G., et Tracy L. Raivio. 2002. « A Third Envelope Stress Signal Transduction Pathway in *Escherichia Coli* ». *Molecular Microbiology* 45(6):1599-1611. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03112.x.
- Rahlwes, Kathryn C., Ian L. Sparks, et Yasu S. Morita. 2019. « Cell Walls and Membranes of Actinobacteria ». *Sub-Cellular Biochemistry* 92:417-69. doi: 10.1007/978-3-030-18768-2_13.
- Rahman, Obaidur, Stephen P. Cummings, Dean J. Harrington, et Iain C. Sutcliffe. 2008. « Methods for the Bioinformatic Identification of Bacterial Lipoproteins Encoded in the Genomes of Gram-Positive Bacteria ». *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24(11):2377-82. doi: 10.1007/s11274-008-9795-2.
- Raivio, Tracy L. 2014. « Everything Old Is New Again: An Update on Current Research on the Cpx Envelope Stress Response ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1843(8):1529-41. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.10.018.
- Ramasamy, Sureshkumar, Ravinder Abrol, Christian J. M. Suloway, et William M. Clemons. 2013. « The glove-like structure of the conserved membrane protein TatC provides insight into signal sequence recognition in twin-arginine translocation ». *Structure (London, England : 1993)* 21(5):777-88. doi: 10.1016/j.str.2013.03.004.
- Ramirez, Nicholas A., Asis Das, et Hung Ton-That. 2020. « New Paradigms of Pilus Assembly Mechanisms in Gram-Positive Actinobacteria ». *Trends in Microbiology* 28(12):999-1009. doi: 10.1016/j.tim.2020.05.008.
- Rands, Chris M., Harald Brüssow, et Evgeny M. Zdobnov. 2019. « Comparative Genomics Groups Phages of Negativicutes and Classical Firmicutes despite Different Gram-Staining Properties ». *Environmental Microbiology* 21(11):3989-4001. doi: 10.1111/1462-2920.14746.
- Ray Chaudhuri, Shaon, Mandakini Gogoi, Tethi Biswas, Soumya Chatterjee, Chaitali Chanda, Ronald Jamatia, Ajoy Modak, Sunil K. Sett, et Indranil Mukherjee. 2020. « Optimization of Bio-Chemical Degumming of Ramie Fiber for Improved Strength & Luster ». *Biotechnology Reports* 28:e00532. doi: 10.1016/j.btre.2020.e00532.
- Reigoto, Agatha M., Sarah A. Andrade, Marianna C. R. R. Seixas, Manoel L. Costa, et Claudia Mermelstein. 2021. « A Comparative Study on the Use of Microscopy in Pharmacology and Cell Biology Research » édité par Y. Garini. *PLOS ONE* 16(1):e0245795. doi: 10.1371/journal.pone.0245795.
- Reverchon, Sylvie, Carine Rouanet, Dominique Expert, et William Nasser. 2002. « Characterization of Indigoidine Biosynthetic Genes in *Erwinia Chrysanthemi* and Role of This Blue Pigment in Pathogenicity ». *Journal of Bacteriology* 184(3):654-65. doi: 10.1128/JB.184.3.654-665.2002.
- Rhodijs, Virgil A., Won Chul Suh, Gen Nonaka, Joyce West, et Carol A. Gross. 2005. « Conserved and Variable Functions of the σ E Stress Response in Related Genomes » édité par J. A. Eisen. *PLoS Biology* 4(1):e2. doi: 10.1371/journal.pbio.0040002.
- Ricci, Dante P., et Thomas J. Silhavy. 2019. « Outer Membrane Protein Insertion by the β -Barrel Assembly Machine » édité par M. Sandkvist, E. Cascales, et P. J. Christie. *EcoSal Plus* 8(2):ecosalplus.ESP-0035-2018. doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0035-2018.

- Rimal, Binayak, Sibusiso Senzani, Christopher Ealand, Gyanu Lamichhane, Bavesh Kana, et Sung Joon Kim. 2022. « Peptidoglycan Compositional Analysis of Mycobacterium Smegmatis Using High-Resolution LC–MS ». *Scientific Reports* 12(1):11061. doi: 10.1038/s41598-022-15324-1.
- Ringel, Peter David, Di Hu, et Marek Basler. 2017. « The Role of Type VI Secretion System Effectors in Target Cell Lysis and Subsequent Horizontal Gene Transfer ». *Cell Reports* 21(13):3927-40. doi: 10.1016/j.celrep.2017.12.020.
- Rocaboy, Mathieu, Raphael Herman, Eric Sauvage, Han Remaut, Kristof Moonens, Mohammed Terrak, Paulette Charlier, et Frederic Kerff. 2013. « The Crystal Structure of the Cell Division Amidase AmiC Reveals the Fold of the AMIN Domain, a New Peptidoglycan Binding Domain ». *Molecular Microbiology* 90(2):267-77. doi: 10.1111/mmi.12361.
- Rogers, H. J. 1970. « Bacterial Growth and the Cell Envelope ». *Bacteriological Reviews* 34(2):194-214. doi: 10.1128/br.34.2.194-214.1970.
- Rojas, Enrique R., Gabriel Billings, Pascal D. Odermatt, George K. Auer, Lillian Zhu, Amanda Miguel, Fred Chang, Douglas B. Weibel, Julie A. Theriot, et Kerwyn Casey Huang. 2018. « The Outer Membrane Is an Essential Load-Bearing Element in Gram-Negative Bacteria ». *Nature* 559(7715):617-21. doi: 10.1038/s41586-018-0344-3.
- Rondelet, Arnaud, et Guy Condemine. 2012. « SurA Is Involved in the Targeting to the Outer Membrane of a Tat Signal Sequence-Anchored Protein ». *Journal of Bacteriology* 194(22):6131-42. doi: 10.1128/JB.01419-12.
- Roujeinikova, Anna. 2008. « Crystal Structure of the Cell Wall Anchor Domain of MotB, a Stator Component of the Bacterial Flagellar Motor: Implications for Peptidoglycan Recognition ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(30):10348-53. doi: 10.1073/pnas.0803039105.
- Rowlett, Veronica W., Venkata K. P. S. Mallampalli, Anja Karlstaedt, William Dowhan, Heinrich Taegtmeier, William Margolin, et Heidi Vitrac. 2017. « Impact of Membrane Phospholipid Alterations in *Escherichia Coli* on Cellular Function and Bacterial Stress Adaptation » édité par V. J. DiRita. *Journal of Bacteriology* 199(13). doi: 10.1128/JB.00849-16.
- Ruan, Xiang, David E. Loyola, Cristina L. Marolda, José M. Perez-Donoso, et Miguel A. Valvano. 2012. « The WaaL O-antigen lipopolysaccharide ligase has features in common with metal ion-independent inverting glycosyltransferases ». *Glycobiology* 22(2):288-99. doi: 10.1093/glycob/cwr150.
- Ruiz, Natividad, Daniel Kahne, et Thomas J. Silhavy. 2009. « Transport of Lipopolysaccharide across the Cell Envelope: The Long Road of Discovery ». *Nature Reviews Microbiology* 7(9):677-83. doi: 10.1038/nrmicro2184.
- Rupert Hall, A. 1989. « The Leeuwenhoek Lecture, 1988, Antoni Van Leeuwenhoek 1632-1723 ». *Notes and Records of the Royal Society of London* 43(2):249-73. doi: 10.1098/rsnr.1989.0017.
- Saar Dover, R., Bitler, A., Shimoni, E., Trieu-Cuot, P., & Shai, Y. (2015). Multiparametric AFM reveals turgor-responsive net-like peptidoglycan architecture in live streptococci. *Nature Communications*, 6(1), 7193. <https://doi.org/10.1038/ncomms8193>
- Saibil, Helen. 2013. « Chaperone Machines for Protein Folding, Unfolding and Disaggregation ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14(10):630-42. doi: 10.1038/nrm3658.
- Saier Jr., Milton H., et Mikhail V. Bogdanov. 2013. « Membranous Organelles in Bacteria ». *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 23(1-2):5-12. doi: 10.1159/000346496.
- Saini, G., et B. D. Wood. 2020. « Preparation and Characterization of Lipopolysaccharide (LPS) Monolayers for Investigating Their Role in Bacterial Adhesion ». *Materials Today: Proceedings* 29:895-900. doi: 10.1016/j.matpr.2020.05.189.
- Salton, Milton R. J. 1994. « Chapter 1 The Bacterial Cell Envelope - a Historical Perspective ». P. 1-22 in *New Comprehensive Biochemistry*. Vol. 27. Elsevier.
- Samson, Régine, Jean Bernard Legendre, Richard Christen, Marion Fischer-Le Saux, Wafa Achouak, et Louis Gardan. 2005. « Transfer of *Pectobacterium Chrysanthemi* (Burkholder *et al.* 1953) Brenner *et al.* 1973 and *Brenneria Paradisiaca* to the Genus *Dickeya* Gen. Nov. as *Dickeya Chrysanthemi* Comb. Nov. and *Dickeya Paradisiaca* Comb. Nov. and Delineation of Four Novel Species, *Dickeya Dadantii* Sp. Nov., *Dickeya Dianthicola* Sp. Nov., *Dickeya Dieffenbachiae* Sp. Nov. and *Dickeya Zeae* Sp. Nov. ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55(Pt 4):1415-27. doi: 10.1099/ij.s.0.02791-0.
- Samsudin, Firdaus, Alister Boags, Thomas J. Piggot, et Syma Khalid. 2017. « Braun's Lipoprotein Facilitates OmpA Interaction with the *Escherichia Coli* Cell Wall ». *Biophysical Journal* 113(7):1496-1504. doi: 10.1016/j.bpj.2017.08.011.
- Samsudin, Firdaus, Maite L. Ortiz-Suarez, Thomas J. Piggot, Peter J. Bond, et Syma Khalid. 2016. « OmpA: A Flexible Clamp for Bacterial Cell Wall Attachment ». *Structure* 24(12):2227-35. doi: 10.1016/j.str.2016.10.009.
- Sanders, A. N., et M. S. Pavelka. 2013. « Phenotypic Analysis of *Escherichia Coli* Mutants Lacking L,D-Transpeptidases ». *Microbiology* 159(Pt 9):1842-52. doi: 10.1099/mic.0.069211-0.
- Sanders, Akeisha N., Lori F. Wright, et Martin S. Pavelka. 2014. « Genetic Characterization of Mycobacterial L,D-Transpeptidases ». *Microbiology* 160(8):1795-1806. doi: 10.1099/mic.0.078980-0.
- Sandkvist, Maria. 2001. « Type II Secretion and Pathogenesis » édité par D. A. Portnoy. *Infection and Immunity* 69(6):3523-35. doi: 10.1128/IAI.69.6.3523-3535.2001.
- Sandoval, Cristina M., Susan L. Baker, Katarina Jansen, Sandra I. Metzner, et Marcelo C. Sousa. 2011. « Crystal Structure of BamD. An Essential Component of the β -Barrel Assembly Machinery of Gram Negative Bacteria ». *Journal of molecular biology* 409(3):348-57. doi: 10.1016/j.jmb.2011.03.035.
- Sandoz, Kelsi M., Roger A. Moore, Paul A. Beare, Ankur V. Patel, Robert E. Smith, Marshall Bern, Hyea Hwang, Connor J. Cooper, Suzette A. Priola, Jerry M. Parks, James C. Gumbart, Stéphane Mesnage, et Robert A. Heinzen. 2021. « β -Barrel Proteins Tether the Outer Membrane in Many Gram-Negative Bacteria ». *Nature Microbiology* 6(1):19-26. doi: 10.1038/s41564-020-00798-4.
- Sandoz, Kelsi M., David L. Popham, Paul A. Beare, Daniel E. Sturdevant, Bryan Hansen, Vinod Nair, et Robert A. Heinzen. 2016. « Transcriptional Profiling of *Coxiella Burnetii* Reveals Extensive Cell Wall Remodeling in the Small Cell Variant Developmental Form » édité par R. R. Ganta. *PLOS ONE* 11(2):e0149957. doi: 10.1371/journal.pone.0149957.
- Sankaran, K., et H. C. Wu. 1994. « Lipid Modification of Bacterial Prolipoprotein. Transfer of Diacylglycerol Moiety from Phosphatidylglycerol. » *Journal of Biological Chemistry* 269(31):19701-6. doi: 10.1016/S0021-9258(17)32077-X.

- Santin, Yoann G., et Eric Cascales. 2017. « Domestication of a Housekeeping Transglycosylase for Assembly of a Type VI Secretion System ». *EMBO Reports* 18(1):138-49. doi: 10.15252/embr.201643206.
- Sassi, Néjia, Catherine Paul, Amandine Martin, Ali Bettaieb, et Jean-François Jeannin. 2010. « Lipid A-Induced Responses in Vivo ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 667:69-80. doi: 10.1007/978-1-4419-1603-7_7.
- Sauvage, Eric, Frédéric Kerff, Mohammed Terrak, Juan A. Ayala, et Paulette Charlier. 2008. « The Penicillin-Binding Proteins: Structure and Role in Peptidoglycan Biosynthesis ». *FEMS Microbiology Reviews* 32(2):234-58. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00105.x.
- Schaub, Ryan E., Jonathan D. Lenz, et Joseph P. Dillard. 2016. « Analysis of Peptidoglycan Fragment Release ». P. 185-200 in *Bacterial Cell Wall Homeostasis*. Vol. 1440, édité par H.-J. Hong. New York, NY: Springer New York.
- Scheurwater, Edie M., et Lori L. Burrows. 2011. « Maintaining Network Security: How Macromolecular Structures Cross the Peptidoglycan Layer: Transit of Macromolecular Structures through Peptidoglycan ». *FEMS Microbiology Letters* 318(1):1-9. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02228.x.
- Scheurwater, Edie, Chris W. Reid, et Anthony J. Clarke. 2008. « Lytic Transglycosylases: Bacterial Space-Making Autolysins ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40(4):586-91. doi: 10.1016/j.biocel.2007.03.018.
- Schleifer, K. H., et O. Kandler. 1972. « Peptidoglycan Types of Bacterial Cell Walls and Their Taxonomic Implications ». *Bacteriological Reviews* 36(4):407-77. doi: 10.1128/br.36.4.407-477.1972.
- Schneewind, Olaf, Peter Model, et Vincent A. Fischetti. 1992. « Sorting of Protein a to the Staphylococcal Cell Wall ». *Cell* 70(2):267-81. doi: 10.1016/0092-8674(92)90101-H.
- Schneider, Tanja, et Hans-Georg Sahl. 2010. « An Oldie but a Goodie – Cell Wall Biosynthesis as Antibiotic Target Pathway ». *International Journal of Medical Microbiology* 300(2-3):161-69. doi: 10.1016/j.ijmm.2009.10.005.
- Schwechheimer, Carmen, Adam Kulp, et Meta J. Kuehn. 2014. « Modulation of Bacterial Outer Membrane Vesicle Production by Envelope Structure and Content ». *BMC Microbiology* 14(1):324. doi: 10.1186/s12866-014-0324-1.
- Sekiguchi, J., K. Akeo, H. Yamamoto, F. K. Khasanov, J. C. Alonso, et A. Kuroda. 1995. « Nucleotide sequence and regulation of a new putative cell wall hydrolase gene, cwld, which affects germination in *Bacillus subtilis* ». *Journal of Bacteriology* 177(19):5582-89.
- Sha, J., A. A. Fadl, G. R. Klimpel, D. W. Niesel, V. L. Popov, et A. K. Chopra. 2004. « The Two Murein Lipoproteins of *Salmonella Enterica* Serovar *Typhimurium* Contribute to the Virulence of the Organism ». *Infection and Immunity* 72(7):3987-4003. doi: 10.1128/IAI.72.7.3987-4003.2004.
- Shaliutina-Loginova, Anna, Olivera Francetic, et Pavel Doležal. 2023. « Bacterial Type II Secretion System and Its Mitochondrial Counterpart » édité par M. Sandkvist et J. Yount. *mBio* 14(2):e03145-22. doi: 10.1128/mbio.03145-22.
- Shearer, Jonathan, Damien Jefferies, et Syma Khalid. 2019. « Outer Membrane Proteins OmpA, FhuA, OmpF, EstA, BtuB, and OmpX Have Unique Lipopolysaccharide Fingerprints ». *Journal of Chemical Theory and Computation* 15(4):2608-19. doi: 10.1021/acs.jctc.8b01059.
- Sheikh, Jalaluddin, Susan Hicks, Monique Dall'Agnol, Alan D. Phillips, et James P. Nataro. 2001. « Roles for Fis and YafK in Biofilm Formation by Enteroaggregative *Escherichia Coli* ». *Molecular Microbiology* 41(5):983-97. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02512.x.
- Sheng, Qi, Meng-Yao Zhang, Si-Min Liu, Zhuo-Wei Chen, Pei-Ling Yang, Hong-Su Zhang, Meng-Yun Liu, Kang Li, Long-Sheng Zhao, Ning-Hua Liu, Lu-Ning Liu, Xiu-Lan Chen, Jamie K. Hobbs, Simon J. Foster, Yu-Zhong Zhang, et Hai-Nan Su. 2023. « In Situ Visualization of Braun's Lipoprotein on *E. Coli* Sacculi ». *Science Advances* 9(3):eadd8659. doi: 10.1126/sciadv.add8659.
- Shevchik, V. E., G. Condemine, et J. Robert-Baudouy. 1994. « Characterization of DsbC, a Periplasmic Protein of *Erwinia Chrysanthemi* and *Escherichia Coli* with Disulfide Isomerase Activity. » *The EMBO Journal* 13(8):2007-12. doi: 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06470.x.
- Shevchik, Vladimir E., et Guy Condemine. 1998. « Functional Characterization of the *Erwinia Chrysanthemi* Outs Protein, an Element of a Type II Secretion System ». *Microbiology* 144(11):3219-28. doi: 10.1099/00221287-144-11-3219.
- Shevchik, Vladimir E., et Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat. 1997. « Identification of a Bacterial Pectin Acetyl Esterase in *Erwinia Chrysanthemi* 3937 ». *Molecular Microbiology* 24(6):1285-1301. doi: 10.1046/j.1365-2958.1997.4331800.x.
- Shevchik, Vladimir E., et Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat. 2003. « PaeX, a Second Pectin Acetyl Esterase of *Erwinia Chrysanthemi* 3937 ». *Journal of Bacteriology* 185(10):3091-3100. doi: 10.1128/JB.185.10.3091-3100.2003.
- Shiba, Yasuhiro, Hiroyoshi Miyagawa, Hideki Nagahama, Kenji Matsumoto, Daitetsu Kondo, Satoshi Matsuoka, Kouji Matsumoto, et Hiroshi Hara. 2012. « Exploring the Relationship between Lipoprotein Mislocalization and Activation of the Rcs Signal Transduction System in *Escherichia Coli* ». *Microbiology* 158(5):1238-48. doi: 10.1099/mic.0.056945-0.
- Shu, Wei, Jie Liu, Hong Ji, et Min Lu. 2000. « Core Structure of the Outer Membrane Lipoprotein from *Escherichia Coli* at 1.9 Å Resolution 1 Edited by D. Rees ». *Journal of Molecular Biology* 299(4):1101-12. doi: 10.1006/jmbi.2000.3776.
- Sidow, Thomas, Lars Johannsen, et Harald Labischinski. 1990. « Penicillin-Induced Changes in the Cell Wall Composition of *Staphylococcus Aureus* before the Onset of Bacteriolysis ». *Archives of Microbiology* 154(1):73-81. doi: 10.1007/BF00249181.
- Silhavy, T. J., D. Kahne, et S. Walker. 2010. « The Bacterial Cell Envelope ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2(5):a000414-a000414. doi: 10.1101/cshperspect.a000414.
- Simpson, Brent W., Marta Nieckarz, Victor Pinedo, Amanda B. McLean, Felipe Cava, et M. Stephen Trent. 2021. « *Acinetobacter Baumannii* Can Survive with an Outer Membrane Lacking Lipooligosaccharide Due to Structural Support from Elongasome Peptidoglycan Synthesis ». *mBio*. doi: 10.1128/mBio.03099-21.
- Singh, Santosh Kumar, L. SaiSree, Ravi N. Amrutha, et Manjula Reddy. 2012. « Three Redundant Murein Endopeptidases Catalyse an Essential Cleavage Step in Peptidoglycan Synthesis of *Escherichia Coli* K12 ». *Molecular Microbiology* 86(5):1036-51. doi: 10.1111/mmi.12058.
- Sklar, Joseph G., Tao Wu, Daniel Kahne, et Thomas J. Silhavy. 2007. « Defining the Roles of the Periplasmic Chaperones SurA, Skp, and DegP in *Escherichia Coli* ». *Genes & Development* 21(19):2473-84. doi: 10.1101/gad.1581007.

- Skórko-Glonek, Joanna, Alicja Wawrzynów, Konrad Krzewski, Katarzyna Kurpierz, et Barbara Lipińska. 1995. « Site-Directed Mutagenesis of the HtrA(DegP) Serine Protease, Whose Proteolytic Activity Is Indispensable for *Escherichia Coli* Survival at Elevated Temperatures ». *Gene* 163(1):47-52. doi: 10.1016/0378-1119(95)00406-V.
- Solan, Ron, Joana Pereira, Andrei N. Lupas, Rachel Kolodny, et Nir Ben-Tal. 2021. « Gram-negative outer-membrane proteins with multiple β -barrel domains ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118(31):e2104059118. doi: 10.1073/pnas.2104059118.
- Sonntag, I., H. Schwarz, Y. Hirota, et U. Henning. 1978. « Cell Envelope and Shape of *Escherichia Coli*: Multiple Mutants Missing the Outer Membrane Lipoprotein and Other Major Outer Membrane Proteins. » *Journal of Bacteriology* 136(1):280-85. doi: 10.1128/JB.136.1.280-285.1978.
- de Souza, Robson Francisco, Vivek Anantharaman, Sandro José de Souza, L. Aravind, et Frederico J. Gueiros-Filho. 2008. « AMIN domains have a predicted role in localization of diverse periplasmic protein complexes ». *Bioinformatics* 24(21):2423-26. doi: 10.1093/bioinformatics/btn449.
- Sperandeo, Paola, Alessandra M. Martorana, et Alessandra Polissi. 2017. « The lipopolysaccharide transport (Lpt) machinery: A nonconventional transporter for lipopolysaccharide assembly at the outer membrane of Gram-negative bacteria ». *The Journal of Biological Chemistry* 292(44):17981-90. doi: 10.1074/jbc.R117.802512.
- Spiess, Christoph, Alexandra Beil, et Michael Ehrmann. 1999. « A Temperature-Dependent Switch from Chaperone to Protease in a Widely Conserved Heat Shock Protein ». *Cell* 97(3):339-47. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80743-6.
- Spirig, Thomas, Ethan M. Weiner, et Robert T. Clubb. 2011. « Sortase Enzymes in Gram-positive Bacteria ». *Molecular Microbiology* 82(5):1044-59. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07887.x.
- Spratt, Brian G., et Arthur B. Pardee. 1975. « Penicillin-Binding Proteins and Cell Shape in *E. Coli* ». *Nature* 254(5500):516-17. doi: 10.1038/254516a0.
- Stankeviciute, Gabriele, Amanda Miguel, Atanas Radkov, Seemay Chou, Kerwyn Huang, et Eric Klein. 2019. « Differential modes of crosslinking establish spatially distinct regions of peptidoglycan in *Caulobacter crescentus* ». *Molecular Microbiology* 111. doi: 10.1111/mmi.14199.
- Stietz, Maria Silvina, Xiaoye Liang, Hao Li, Xinran Zhang, et Tao G. Dong. 2020. « TssA–TssM–TagA Interaction Modulates Type VI Secretion System Sheath-Tube Assembly in *Vibrio Cholerae* ». *Nature Communications* 11(1):5065. doi: 10.1038/s41467-020-18807-9.
- Stock, J. B., B. Rauch, et S. Roseman. 1977. « Periplasmic Space in *Salmonella Typhimurium* and *Escherichia Coli* ». *The Journal of Biological Chemistry* 252(21):7850-61.
- Straume, Daniel, Katarzyna Wiaroslawa Piechowiak, Morten Kjos, et Leiv Sigve Håvarstein. 2021. « Class A PBPs: It Is Time to Rethink Traditional Paradigms ». *Molecular Microbiology* 116(1):41-52. doi: 10.1111/mmi.14714.
- Strozen, T. G., H. Stanley, Y. Gu, J. Boyd, M. Bagdasarian, M. Sandkvist, et S. P. Howard. 2011. « Involvement of the GspAB Complex in Assembly of the Type II Secretion System Secretin of *Aeromonas* and *Vibrio* Species ». *Journal of Bacteriology* 193(9):2322-31. doi: 10.1128/JB.01413-10.
- Strozen, Timothy G., Gang Li, et S. Peter Howard. 2012. « YghG (GspS β) Is a Novel Pilot Protein Required for Localization of the GspS β Type II Secretion System Secretin of Enterotoxigenic *Escherichia Coli* » édité par A. Camilli. *Infection and Immunity* 80(8):2608-22. doi: 10.1128/IAI.06394-11.
- Stull, Frederick, Jean-Michel Betton, et James C. A. Bardwell. 2018. « Periplasmic Chaperones and Prolyl Isomerases » édité par J. M. Slauch et M. Ehrmann. *EcoSal Plus* 8(1):ecosalplus.ESP-0005-2018. doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0005-2018.
- Suits, Michael D. L., Benjamin Pluvinage, Adrienne Law, Yan Liu, Angelina S. Palma, Wengang Chai, Ten Feizi, et Alisdair B. Boraston. 2014. « Conformational Analysis of the *Streptococcus pneumoniae* Hyaluronate Lyase and Characterization of Its Hyaluronan-specific Carbohydrate-binding Module ». *The Journal of Biological Chemistry* 289(39):27264-77. doi: 10.1074/jbc.M114.578435.
- Sun, Yen, Tzu-Lin Sun, et Huey W. Huang. 2014. « Physical Properties of *Escherichia coli* Spheroplast Membranes ». *Biophysical Journal* 107(9):2082-90. doi: 10.1016/j.bpj.2014.09.034.
- Surmann, Kristin, Emina Ćudić, Elke Hammer, et Sabine Hunke. 2016. « Molecular and Proteome Analyses Highlight the Importance of the Cpx Envelope Stress System for Acid Stress and Cell Wall Stability in *Escherichia Coli* ». *MicrobiologyOpen* 5(4):582-96. doi: 10.1002/mbo3.353.
- Sutcliffe, I. C. 1998. « Cell Envelope Composition and Organisation in the Genus *Rhodococcus* ». *Antonie Van Leeuwenhoek* 74(1-3):49-58. doi: 10.1023/a:1001747726820.
- Sutterlin, Holly A., Handuo Shi, Kerrie L. May, Amanda Miguel, Somya Khare, Kerwyn Casey Huang, et Thomas J. Silhavy. 2016. « Disruption of Lipid Homeostasis in the Gram-Negative Cell Envelope Activates a Novel Cell Death Pathway ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113(11). doi: 10.1073/pnas.1601375113.
- Swaminathan, Anu, Anjali Mandlik, Arlene Swierczynski, Andrew Gaspar, Asis Das, et Hung Ton-That. 2007. « Housekeeping Sortase Facilitates the Cell Wall Anchoring of Pilus Polymers in *Corynebacterium Diphtheriae* ». *Molecular Microbiology* 66(4):961-74. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05968.x.
- Szczepaniak, Joanna, Peter Holmes, Karthik Rajasekar, Renata Kaminska, Firdaus Samsudin, Patrick George Inns, Patrice Rassam, Syma Khalid, Seán M. Murray, Christina Redfield, et Colin Kleanthous. 2020. « The Lipoprotein Pal Stabilises the Bacterial Outer Membrane during Constriction by a Mobilisation-and-Capture Mechanism ». *Nature Communications* 11(1):1305. doi: 10.1038/s41467-020-15083-5.
- Szewczyk, J., et J. F. Collet. 2016. « The Journey of Lipoproteins Through the Cell ». P. 1-50 in *Advances in Microbial Physiology*. Vol. 69. Elsevier.
- Szwedziak, Piotr, et Jan Löwe. 2013. « Do the Divisome and Elongasome Share a Common Evolutionary Past? » *Current Opinion in Microbiology* 16(6):745-51. doi: 10.1016/j.mib.2013.09.003.
- Tacconelli, Evelina, Elena Carrara, Alessia Savoldi, Stephan Harbarth, Marc Mendelson, Dominique L. Monnet, Céline Pulcini, Gunnar Kahlmeter, Jan Kluytmans, Yehuda Carmeli, Marc Ouellette, Kevin Outtersson, Jean Patel, Marco Cavaleri, Edward M. Cox, Chris R. Houchens, M. Lindsay Grayson, Paul Hansen, Nalini Singh, Ursula Theuretzbacher, Nicola Magrini, Aaron Oladipo Aboderin,

Seif Salem Al-Abri, Nordiah Awang Jalil, Nur Benzonana, Sanjay Bhattacharya, Adrian John Brink, Francesco Robert Burkert, Otto Cars, Giuseppe Cornaglia, Oliver James Dyar, Alex W. Friedrich, Ana C. Gales, Sumanth Gandra, Christian Georg Giske, Debra A. Goff, Herman Goossens, Thomas Gottlieb, Manuel Guzman Blanco, Waleria Hryniewicz, Deepthi Kattula, Timothy Jinks, Souha S. Kanj, Lawrence Kerr, Marie-Paule Kieny, Yang Soo Kim, Roman S. Kozlov, Jaime Labarca, Ramanan Laxminarayan, Karin Leder, Leonard Leibovici, Gabriel Levy-Hara, Jasper Littman, Surbhi Malhotra-Kumar, Vikas Manchanda, Lorenzo Moja, Babacar Ndoeye, Angelo Pan, David L. Paterson, Mical Paul, Haibo Qiu, Pilar Ramon-Pardo, Jesús Rodríguez-Baño, Maurizio Sanguinetti, Sharmila Sengupta, Mike Sharland, Massinissa Si-Mehand, Lynn L. Silver, Wonkeung Song, Martin Steinbakk, Jens Thomsen, Guy E. Thwaites, Jos Wm Van Der Meer, Nguyen Van Kinh, Silvio Vega, Maria Virginia Villegas, Agnes Wechsler-Fördös, Heiman Frank Louis Wertheim, Evelyn Wesangula, Neil Woodford, Fidan O. Yilmaz, et Anna Zorzet. 2018. « Discovery, Research, and Development of New Antibiotics: The WHO Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria and Tuberculosis ». *The Lancet Infectious Diseases* 18(3):318-27. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3.

- Taguchi, Atsushi, Daniel Kahne, et Suzanne Walker. 2019. « Chemical Tools to Characterize Peptidoglycan Synthases ». *Current Opinion in Chemical Biology* 53:44-50. doi: 10.1016/j.cbpa.2019.07.009.
- Taib, Najwa, Daniela Megrian, Jerzy Witwinowski, Panagiotis Adam, Daniel Poppleton, Guillaume Borrel, Christophe Beloin, et Simonetta Gribaldo. 2020. « Genome-Wide Analysis of the Firmicutes Illuminates the Diderm/Monoderm Transition ». *Nature Ecology & Evolution* 4(12):1661-72. doi: 10.1038/s41559-020-01299-7.
- Takahashi, Sawako, Marin Mizuma, Satoshi Kami, et Hiromi Nishida. 2020. « Species-Dependent Protoplast Enlargement Involves Different Types of Vacuole Generation in Bacteria ». *Scientific Reports* 10(1):8832. doi: 10.1038/s41598-020-65759-7.
- Takahashi, Sawako, et Hiromi Nishida. 2022. « Effects of Heterologous Genome Microinjection on the Enlargement of Enterococcus Faecalis Protoplasts ». *Current Research in Microbial Sciences* 3:100104. doi: 10.1016/j.crmicr.2022.100104.
- Tamura, Akira, et G. P. Manire. 1968. « Effect of Penicillin on the Multiplication of Meningopneumonitis Organisms (*Chlamydia Psittaci*) ». *Journal of Bacteriology* 96(4):875-80. doi: 10.1128/jb.96.4.875-880.1968.
- Tanaka, Kimie, Shin-Ichi Matsuyama, et Hajime Tokuda. 2001. « Deletion of *lolB*, Encoding an Outer Membrane Lipoprotein, Is Lethal for *Escherichia Coli* and Causes Accumulation of Lipoprotein Localization Intermediates in the Periplasm ». *Journal of Bacteriology* 183(22):6538-42. doi: 10.1128/JB.183.22.6538-6542.2001.
- Taylor, Edward J., Tracey M. Gloster, Johan P. Turkenburg, Florence Vincent, A. Marek Brzozowski, Claude Dupont, François Shareck, Maria S. J. Centeno, José A. M. Prates, Vladimír Puchart, Luís M. A. Ferreira, Carlos M. G. A. Fontes, Peter Biely, et Gideon J. Davies. 2006. « Structure and Activity of Two Metal Ion-Dependent Acetylxylylan Esterases Involved in Plant Cell Wall Degradation Reveals a Close Similarity to Peptidoglycan Deacetylases ». *The Journal of Biological Chemistry* 281(16):10968-75. doi: 10.1074/jbc.M513066200.
- Taylor, Jeannette. 2008. « Cryo-Fracture or Freeze-Fracture, a Method to Expose Internal Tissue Surfaces and Cell Surfaces for Viewing in the Scanning Electron Microscope ». *Microscopy Today* 16(4):56-59. doi: 10.1017/S1551929500059812.
- van Teeseling, Muriel C. F., Rob J. Mesman, Erkin Kuru, Akbar Espaillet, Felipe Cava, Yves V. Brun, Michael S. VanNieuwenhze, Boran Kartal, et Laura van Niftrik. 2015. « Anammox Planctomycetes Have a Peptidoglycan Cell Wall ». *Nature Communications* 6(1):6878. doi: 10.1038/ncomms7878.
- Tendiuk, N., Konnova, T., Petrova, O., Osipova, E., Mukhametzyanov, T., Makshakova, O., & Gorshkov, V. (2022). "Structure-Functional Characteristics of the Svx Protein—The Virulence Factor of the Phytopathogenic Bacterium *Pectobacterium atrosepticum*". *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), 6914. <https://doi.org/10.3390/ijms23136914>
- Thomassin, Jenny-Lee, Javier Santos Moreno, Ingrid Guilvout, Guy Tran Van Nhieu, et Olivera Francetic. 2017. « The Trans-envelope Architecture and Function of the Type 2 Secretion System: New Insights Raising New Questions ». *Molecular Microbiology* 105(2):211-26. doi: 10.1111/mmi.13704.
- Thong, Shuhua, Bilge Ercan, Federico Torta, Zhen Yang Fong, Hui Yi Alvina Wong, Markus R. Wenk, et Shu-Sin Chng. 2016. « Defining Key Roles for Auxiliary Proteins in an ABC Transporter That Maintains Bacterial Outer Membrane Lipid Asymmetry ». *eLife* 5:e19042. doi: 10.7554/eLife.19042.
- Tian, Yanli, Yuqiang Zhao, Xiaoli Yuan, Jianping Yi, Jiaqin Fan, Zhigang Xu, Baishi Hu, Solke H. De Boer, et Xiang Li. 2016. « *Dickeya Fangzhongdai* Sp. Nov., a Plant-Pathogenic Bacterium Isolated from Pear Trees (*Pyrus Pyrifolia*) ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66(8):2831-35. doi: 10.1099/ijsem.0.001060.
- Tocheva, Elitza I., Eric G. Matson, Dylan M. Morris, Farshid Moussavi, Jared R. Leadbetter, et Grant J. Jensen. 2011. « Peptidoglycan Remodeling and Conversion of an Inner Membrane into an Outer Membrane during Sporulation ». *Cell* 146(5):799-812. doi: 10.1016/j.cell.2011.07.029.
- Tocheva, Elitza I., Davi R. Ortega, et Grant J. Jensen. 2016. « Sporulation, Bacterial Cell Envelopes and the Origin of Life ». *Nature Reviews Microbiology* 14(8):535-42. doi: 10.1038/nrmicro.2016.85.
- Tomasek, David, Shaun Rawson, James Lee, Joseph S. Wzorek, Stephen C. Harrison, Zongli Li, et Daniel Kahne. 2020. « Structure of a Nascent Membrane Protein as It Folds on the BAM Complex ». *Nature* 583(7816):473-78. doi: 10.1038/s41586-020-2370-1.
- Toth, I. K., J. M. Van Der Wolf, G. Saddler, E. Lojkowska, V. Hélias, M. Pirhonen, L. Tsrör Lahkim, et J. G. Elphinstone. 2011. « *Dickeya* Species: An Emerging Problem for Potato Production in Europe: *Dickeya* Spp. on Potato in Europe ». *Plant Pathology* 60(3):385-99. doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02427.x.
- Toth, Marta, Mijoon Lee, Nichole K. Stewart, et Sergei B. Vakulenko. 2022. « Effects of Inactivation of D,D-Transpeptidases of *Acinetobacter Baumannii* on Bacterial Growth and Susceptibility to β -Lactam Antibiotics ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 66(1):e0172921. doi: 10.1128/AAC.01729-21.
- Toth, Marta, Nichole K. Stewart, Clyde A. Smith, Mijoon Lee, et Sergei B. Vakulenko. 2022. « The L,D-Transpeptidase LdtAb from *Acinetobacter Baumannii* Is Poorly Inhibited by Carbapenems and Has a Unique Structural Architecture ». *ACS Infectious Diseases* acsinfecdis.2c00321. doi: 10.1021/acsinfecdis.2c00321.
- Tourte, Maxime, Philippe Schaeffer, Vincent Grossi, et Phil M. Oger. 2020. « Functionalized Membrane Domains: An Ancestral Feature of Archaea? » *Frontiers in Microbiology* 11:526. doi: 10.3389/fmicb.2020.00526.

- Triboulet, Sébastien, Vincent Dubée, Lauriane Lecoq, Catherine Bougault, Jean-Luc Mainardi, Louis B. Rice, Mélanie Ethève-Quellejeu, Laurent Gutmann, Arul Marie, Lionel Dubost, Jean-Emmanuel Hugonnet, Jean-Pierre Simorre, et Michel Arthur. 2013. « Kinetic Features of L,D-Transpeptidase Inactivation Critical for β -Lactam Antibacterial Activity » édité par I. G. Boneca. *PLoS ONE* 8(7):e67831. doi: 10.1371/journal.pone.0067831.
- Tripathi, Nishant, et Amit Sapra. 2023. « Gram Staining ». in *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- Trouve, Jennyfer, André Zapun, Christopher Arthaud, Claire Durmort, Anne Marie Di Guilmi, Bill Söderström, Anais Pelletier, Christophe Grangeasse, Dominique Bourgeois, Yung-Sing Wong, et Cecile Morlot. 2021. « Nanoscale Dynamics of Peptidoglycan Assembly during the Cell Cycle of *Streptococcus Pneumoniae* ». *Current Biology* 31(13):2844-2856.e6. doi: 10.1016/j.cub.2021.04.041.
- Trudelle, Danielle M., Daniel W. Bryan, Shahla Ray, John P. Munafo, et Thomas G. Denes. 2022. « Analysis of Derivatized Wall Teichoic Acids Confirms That a Mutation in Phage-Resistant *Listeria Monocytogenes* Impacts Rhamnose Decoration ». *ACS Omega* 7(20):17002-13. doi: 10.1021/acsomega.1c07403.
- Turner, Robert D., Emma C. Ratcliffe, Richard Wheeler, Ramin Golestanian, Jamie K. Hobbs, et Simon J. Foster. 2010. « Peptidoglycan Architecture Can Specify Division Planes in *Staphylococcus Aureus* ». *Nature Communications* 1(1):26. doi: 10.1038/ncomms1025.
- Turner, R. D., Hurd, A. F., Cadby, A., Hobbs, J. K., & Foster, S. J. (2013). Cell wall elongation mode in Gram-negative bacteria is determined by peptidoglycan architecture. *Nature Communications*, 4(1), 1496. <https://doi.org/10.1038/ncomms2503>
- Turner, Robert D., Stéphane Mesnage, Jamie K. Hobbs, et Simon J. Foster. 2018. « Molecular Imaging of Glycan Chains Couples Cell-Wall Polysaccharide Architecture to Bacterial Cell Morphology ». *Nature Communications* 9(1):1263. doi: 10.1038/s41467-018-03551-y.
- Typas, Athanasios, Manuel Banzhaf, Carol A. Gross, et Waldemar Vollmer. 2012. « From the Regulation of Peptidoglycan Synthesis to Bacterial Growth and Morphology ». *Nature Reviews Microbiology* 10(2):123-36. doi: 10.1038/nrmicro2677.
- Uchida, Kinya, et Kô Aida. 1979. « Taxonomic Significance Of Cell-Wall Acyl Type In *Corynebacterium-Mycobacterium-Nocardia* Group By A Glycolate Test ». *The Journal of General and Applied Microbiology* 25(3):169-83. doi: 10.2323/jgam.25.169.
- Uhlich, Gaylen A., Nereus W. Gunther, Darrell O. Bayles, et Derek A. Mosier. 2009. « The CsgA and Lpp Proteins of an *Escherichia Coli* O157:H7 Strain Affect HEp-2 Cell Invasion, Motility, and Biofilm Formation ». *Infection and Immunity* 77(4):1543-52. doi: 10.1128/IAI.00949-08.
- Ulaganathan, Venkatasubramanian, Lori Buetow, et William N. Hunter. 2007. « Nucleotide Substrate Recognition by UDP-N-Acetylglucosamine Acyltransferase (LpxA) in the First Step of Lipid A Biosynthesis ». *Journal of Molecular Biology* 369(2):305-12. doi: 10.1016/j.jmb.2007.03.039.
- Urdaneta, Verónica, et Josep Casadesús. 2017. « Interactions between Bacteria and Bile Salts in the Gastrointestinal and Hepatobiliary Tracts ». *Frontiers in Medicine* 4:163. doi: 10.3389/fmed.2017.00163.
- Valas, Ruben E., et Philip E. Bourne. 2011. « The Origin of a Derived Superkingdom: How a Gram-Positive Bacterium Crossed the Desert to Become an Archaeon ». *Biology Direct* 6(1):16. doi: 10.1186/1745-6150-6-16.
- Van Heijenoort, Jean. 2011. « Peptidoglycan Hydrolases of *Escherichia Coli* ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75(4):636-63. doi: 10.1128/MMBR.00022-11.
- Vanderlinde, Elizabeth M., Timothy G. Strozen, Sara B. Hernández, Felipe Cava, et S. Peter Howard. 2017. « Alterations in Peptidoglycan Cross-Linking Suppress the Secretin Assembly Defect Caused by Mutation of GspA in the Type II Secretion System » édité par V. J. DiRita. *Journal of Bacteriology* 199(8). doi: 10.1128/JB.00617-16.
- Vázquez-Laslop, Nora, Hyunwoo Lee, Rong Hu, et Alex A. Neyfakh. 2001. « Molecular Sieve Mechanism of Selective Release of Cytoplasmic Proteins by Osmotically Shocked *Escherichia Coli* ». *Journal of Bacteriology* 183(8):2399-2404. doi: 10.1128/JB.183.8.2399-2404.2001.
- Vermassen, Aurore, Sabine Leroy, Régine Talon, Christian Provot, Magdalena Popowska, et Mickaël Desvaux. 2019. « Cell Wall Hydrolases in Bacteria: Insight on the Diversity of Cell Wall Amidases, Glycosidases and Peptidases Toward Peptidoglycan ». *Frontiers in Microbiology* 10.
- Vigouroux, Antoine, Baptiste Cordier, Andrey Aristov, Laura Alvarez, Gizem Özbaykal, Thibault Chaze, Enno Rainer Oldewurtel, Mariette Matondo, Felipe Cava, David Bikard, et Sven Van Teeffelen. 2020. « Class-A Penicillin Binding Proteins Do Not Contribute to Cell Shape but Repair Cell-Wall Defects ». *eLife* 9:e51998. doi: 10.7554/eLife.51998.
- Vincent, Antony T., Sammy Nyongesa, Isabelle Morneau, Michael B. Reed, Elitza I. Tocheva, et Frederic J. Veyrier. 2018. « The Mycobacterial Cell Envelope: A Relict From the Past or the Result of Recent Evolution? » *Frontiers in Microbiology* 9:2341. doi: 10.3389/fmicb.2018.02341.
- Vocadlo, D. J., G. J. Davies, R. Laine, et S. G. Withers. 2001. « Catalysis by Hen Egg-White Lysozyme Proceeds via a Covalent Intermediate ». *Nature* 412(6849):835-38. doi: 10.1038/35090602.
- Voedts, Henri, Delphine Dorcène, Adam Lodge, Waldemar Vollmer, Michel Arthur, et Jean-Emmanuel Hugonnet. 2021. « Role of Endopeptidases in Peptidoglycan Synthesis Mediated by Alternative Cross-Linking Enzymes in *Escherichia Coli* ». *The EMBO Journal* 40(19):e108126. doi: 10.15252/embj.2021108126.
- Voedts, Henri, Sean P. Kennedy, Guennadi Sezonov, Michel Arthur, et Jean-Emmanuel Hugonnet. 2022. « Genome-Wide Identification of Genes Required for Alternative Peptidoglycan Cross-Linking in *Escherichia Coli* Revealed Unexpected Impacts of β -Lactams ». *Nature Communications* 13(1):7962. doi: 10.1038/s41467-022-35528-3.
- Vollmer, Waldermar, et A. Tomasz. 2000. « The pgdA Gene Encodes for a Peptidoglycan N-Acetylglucosamine Deacetylase in *Streptococcus Pneumoniae* ». *The Journal of Biological Chemistry* 275(27):20496-501. doi: 10.1074/jbc.M910189199.
- Vollmer, Waldemar. 2008. « Structural Variation in the Glycan Strands of Bacterial Peptidoglycan ». *FEMS Microbiology Reviews* 32(2):287-306. doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00088.x.
- Vollmer, Waldemar, et Ute Bertsche. 2008. « Murein (Peptidoglycan) Structure, Architecture and Biosynthesis in *Escherichia Coli* ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1778(9):1714-34. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.06.007.

- Vollmer, Waldemar, Didier Blanot, et Miguel A. De Pedro. 2008. « Peptidoglycan Structure and Architecture ». *FEMS Microbiology Reviews* 32(2):149-67. doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x.
- Vollmer, Waldemar, et Joachim-Volker Höltje. 2004. « The Architecture of the Murein (Peptidoglycan) in Gram-Negative Bacteria: Vertical Scaffold or Horizontal Layer(s)? » *Journal of Bacteriology* 186(18):5978-87. doi: 10.1128/JB.186.18.5978-5987.2004.
- Vollmer, Waldemar, Bernard Joris, Paulette Charlier, et Simon Foster. 2008. « Bacterial Peptidoglycan (Murein) Hydrolases ». *FEMS Microbiology Reviews* 32(2):259-86. doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00099.x.
- Vollmer, Waldemar, et Stephen J. Seligman. 2010. « Architecture of Peptidoglycan: More Data and More Models ». *Trends in Microbiology* 18(2):59-66. doi: 10.1016/j.tim.2009.12.004.
- Voulhoux, Romé, Geneviève Ball, Bérengère Ize, Michael L. Vasil, Andrée Lazdunski, Long-Fei Wu, et Alain Filloux. 2001. « Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway ». *The EMBO Journal* 20(23):6735-41. doi: 10.1093/emboj/20.23.6735.
- Wall, Erin, Nadim Majdalani, et Susan Gottesman. 2018. « The Complex Rcs Regulatory Cascade ». *Annual Review of Microbiology* 72(1):111-39. doi: 10.1146/annurev-micro-090817-062640.
- Walsh, Nathan P., Benjamin M. Alba, Baundauna Bose, Carol A. Gross, et Robert T. Sauer. 2003. « OMP Peptide Signals Initiate the Envelope-Stress Response by Activating DegS Protease via Relief of Inhibition Mediated by Its PDZ Domain ». *Cell* 113(1):61-71. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00203-4.
- Wang, Da, et Carol A. Fierke. 2013. « The BaeSR Regulon Is Involved in Defense against Zinc Toxicity in *E. Coli* ». *Metallomics* 5(4):372. doi: 10.1039/c3mt20217h.
- Wang, I. N., D. L. Smith, et R. Young. 2000. « Holins: The Protein Clocks of Bacteriophage Infections ». *Annual Review of Microbiology* 54:799-825. doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.799.
- Wang, Lei, Quan Wang, et Peter R. Reeves. 2010. « The Variation of O Antigens in Gram-Negative Bacteria ». P. 123-52 in *Endotoxins: Structure, Function and Recognition, Subcellular Biochemistry*, édité par X. Wang et P. J. Quinn. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Wang, Yun-Hao, Hong-He Chen, Zhou Huang, Xiao-Jing Li, Nan Zhou, Chang Liu, Cheng-Ying Jiang, De-Feng Li, et Shuang-Jiang Liu. 2021. « PapA, a peptidoglycan-associated protein, interacts with OmpC and maintains cell envelope integrity ». *Environmental Microbiology* 23(2):600-612. doi: 10.1111/1462-2920.15038.
- Watson, Helen. 2015. « Biological membranes ». *Essays in Biochemistry* 59:43-69. doi: 10.1042/bse0590043.
- Weadge, Joel T., et Anthony J. Clarke. 2007. « *Neisseria Gonorrhoeae* O -Acetylpeptidoglycan Esterase, a Serine Esterase with a Ser-His-Asp Catalytic Triad ». *Biochemistry* 46(16):4932-41. doi: 10.1021/bi700254m.
- Weber, Brent S., Seth W. Hennon, Meredith S. Wright, Nichollas E. Scott, Véronique De Berardinis, Leonard J. Foster, Juan A. Ayala, Mark D. Adams, et Mario F. Feldman. 2016. « Genetic Dissection of the Type VI Secretion System in *Acinetobacter* and Identification of a Novel Peptidoglycan Hydrolase, TagX, Required for Its Biogenesis » édité par V. Sperandio. *mBio* 7(5):e01253-16. doi: 10.1128/mBio.01253-16.
- Weber, Harald, Tino Polen, Johanna Heuveling, Volker F. Wendisch, et Regine Hengge. 2005. « Genome-Wide Analysis of the General Stress Response Network in *Escherichia Coli* : σ^S -Dependent Genes, Promoters, and Sigma Factor Selectivity ». *Journal of Bacteriology* 187(5):1591-1603. doi: 10.1128/JB.187.5.1591-1603.2005.
- Weigand, R. A., et L. I. Rothfield. 1976. « Genetic and Physiological Classification of Periplasmic-Leaky Mutants of *Salmonella Typhimurium* ». *Journal of Bacteriology* 125(1):340-45. doi: 10.1128/jb.125.1.340-345.1976.
- Weiner, L., et P. Model. 1994. « Role of an *Escherichia Coli* Stress-Response Operon in Stationary-Phase Survival. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91(6):2191-95. doi: 10.1073/pnas.91.6.2191.
- Wheeler, R., Mesnage, S., Boneca, I. G., Hobbs, J. K., & Foster, S. J. (2011). Super-resolution microscopy reveals cell wall dynamics and peptidoglycan architecture in ovococcal bacteria. *Molecular Microbiology*, 82(5), 1096-1109. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07871.x>
- White, Richard C., et Nicholas P. Cianciotto. 2019. « Assessing the Impact, Genomics and Evolution of Type II Secretion across a Large, Medically Important Genus: The *Legionella* Type II Secretion Paradigm ». *Microbial Genomics* 5(6). doi: 10.1099/mgen.0.000273.
- Wickus, G. G., A. D. Warth, et J. L. Strominger. 1972. « Appearance of Muramic Lactam during Cortex Synthesis in Sporulating Cultures of *Bacillus Cereus* and *Bacillus Megaterium* ». *Journal of Bacteriology* 111(2):625-27. doi: 10.1128/jb.111.2.625-627.1972.
- Widdick, David A., Kieran Dilks, Govind Chandra, Andrew Bottrill, Mike Naldrett, Mechthild Pohlschröder, et Tracy Palmer. 2006. « The Twin-Arginine Translocation Pathway Is a Major Route of Protein Export in *Streptomyces Coelicolor* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(47):17927-32. doi: 10.1073/pnas.0607025103.
- Wientjes, F. B., C. L. Woldringh, et N. Nanninga. 1991. « Amount of peptidoglycan in cell walls of gram-negative bacteria. » *Journal of Bacteriology* 173(23):7684-91.
- Wilks, Jessica C., et Joan L. Slonczewski. 2007. « pH of the Cytoplasm and Periplasm of *Escherichia Coli*: Rapid Measurement by Green Fluorescent Protein Fluorimetry ». *Journal of Bacteriology* 189(15):5601-7. doi: 10.1128/JB.00615-07.
- Winey, Mark, Janet B. Meehl, Eileen T. O'Toole, et Thomas H. Giddings. 2014. « Conventional Transmission Electron Microscopy » édité par D. G. Drubin. *Molecular Biology of the Cell* 25(3):319-23. doi: 10.1091/mbc.e12-12-0863.
- Winkle, Matthias, Víctor M. Hernández-Rocamora, Karthik Pullela, Emily C. A. Goodall, Alessandra M. Martorana, Joe Gray, Ian R. Henderson, Alessandra Polissi, et Waldemar Vollmer. 2021. « DpaA Detaches Braun's Lipoprotein from Peptidoglycan » édité par K. T. Hughes. *mBio* 12(3):e00836-21. doi: 10.1128/mBio.00836-21.
- Witwinowski, Jerzy, Anna Sartori-Rupp, Najwa Taib, Nika Pende, To Nam Tham, Daniel Poppleton, Jean-Marc Ghigo, Christophe Beloin, et Simonetta Gribaldo. 2022. « An Ancient Divide in Outer Membrane Tethering Systems in Bacteria Suggests a Mechanism for the Diderm-to-Monoderm Transition ». *Nature Microbiology* 7(3):411-22. doi: 10.1038/s41564-022-01066-3.
- Wong, Jaslyn E. M. M., Søren Roi Midtgaard, Kira Gysel, Mikkel B. Thygesen, Kasper K. Sørensen, Knud J. Jensen, Jens Stougaard, Søren Thirup, et Mickaël Blaise. 2015. « An intermolecular binding mechanism involving multiple LysM domains mediates

carbohydrate recognition by an endopeptidase ». *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 71(3):592-605. doi: 10.1107/S139900471402793X.

- Wooldridge, Karl. 2009. "Bacterial Secreted Proteins: Secretary Mechanisms and Role in Pathogenesis" Wymondham: Caister Academic Press.
- Yahashiri, Atsushi, Matthew A. Jorgenson, et David S. Weiss. 2017. « The SPOR Domain, a Widely Conserved Peptidoglycan Binding Domain That Targets Proteins to the Site of Cell Division » édité par W. Margolin. *Journal of Bacteriology* 199(14):e00118-17, e00118-17. doi: 10.1128/JB.00118-17.
- Yakhnina, Anastasiya A., et Thomas G. Bernhardt. 2020. « The Tol-Pal System Is Required for Peptidoglycan-Cleaving Enzymes to Complete Bacterial Cell Division ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117(12):6777-83. doi: 10.1073/pnas.1919267117.
- Yakushi, T., T. Tajima, S. Matsuyama, et H. Tokuda. 1997. « Lethality of the Covalent Linkage between Mislocalized Major Outer Membrane Lipoprotein and the Peptidoglycan of *Escherichia Coli* ». *Journal of Bacteriology* 179(9):2857-62. doi: 10.1128/jb.179.9.2857-2862.1997.
- Yamagata, H., K. Nakamura, et M. Inouye. 1981. « Comparison of the Lipoprotein Gene among the Enterobacteriaceae. DNA Sequence of *Erwinia Amylovora* Lipoprotein Gene ». *The Journal of Biological Chemistry* 256(5):2194-98.
- Yamamoto, Hiroki, Yukiko Miyake, Miharuru Hisaoka, Shin-ichirou Kurosawa, et Junichi Sekiguchi. 2008. « The Major and Minor Wall Teichoic Acids Prevent the Sidewall Localization of Vegetative D,L -endopeptidase LytF in *Bacillus Subtilis* ». *Molecular Microbiology* 70(2):297-310. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06397.x.
- Yan, Zhaofeng, Meng Yin, Dandan Xu, Yongqun Zhu, et Xueming Li. 2017. « Structural Insights into the Secretin Translocation Channel in the Type II Secretion System ». *Nature Structural & Molecular Biology* 24(2):177-83. doi: 10.1038/nsmb.3350.
- Yao, X., M. Jericho, D. Pink, et T. Beveridge. 1999. « Thickness and Elasticity of Gram-Negative Murein Sacculi Measured by Atomic Force Microscopy ». *Journal of Bacteriology* 181(22):6865-75. doi: 10.1128/JB.181.22.6865-6875.1999.
- Yem, D. W., et H. C. Wu. 1978. « Physiological Characterization of an *Escherichia Coli* Mutant Altered in the Structure of Murein Lipoprotein ». *Journal of Bacteriology* 133(3):1419-26. doi: 10.1128/jb.133.3.1419-1426.1978.
- Yousif, S. Y., J. K. Broome-Smith, et B. G. Spratt. 1985. « Lysis of *Escherichia Coli* by β -Lactam Antibiotics: Deletion Analysis of the Role of Penicillin-Binding Proteins 1A and 1B ». *Microbiology* 131(10):2839-45. doi: 10.1099/00221287-131-10-2839.
- Yunck, Rachel, Hongbaek Cho, et Thomas G. Bernhardt. 2016. « Identification of MltG as a Potential Terminase for Peptidoglycan Polymerization in Bacteria ». *Molecular Microbiology* 99(4):700-718. doi: 10.1111/mmi.13258.
- Zahrl, D. 2005. « Peptidoglycan Degradation by Specialized Lytic Transglycosylases Associated with Type III and Type IV Secretion Systems ». *Microbiology* 151(11):3455-67. doi: 10.1099/mic.0.28141-0.
- Zaman, Mehruz, Michael F. Good, et Istvan Toth. 2013. « Nanovaccines and Their Mode of Action ». *Methods* 60(3):226-31. doi: 10.1016/j.ymeth.2013.04.014.
- Zhang, Jingxin, John Hu, Huifang Shen, Yucheng Zhang, Dayuan Sun, Xiaoming Pu, Qiyun Yang, Qirong Fan, et Birun Lin. 2018. « Genomic Analysis of the Phalaenopsis Pathogen *Dickeya Sp PA1*, Representing the Emerging Species *Dickeya Fangzhongdai* ». *Bmc Genomics* 19:782. doi: 10.1186/s12864-018-5154-3.
- Zhang, Shiheng, Shuang Gu, Piers Rycroft, Florence Ruauadel, Frederic Delolme, Xavier Robert, Lionel Ballut, Richard W. Pickersgill, et Vladimir E. Shevchik. 2022. « Scaffolding Protein GspB/OutB Facilitates Assembly of the *Dickeya Dadantii* Type 2 Secretion System by Anchoring the Outer Membrane Secretin Pore to the Inner Membrane and to the Peptidoglycan Cell Wall » édité par R. G. Brennan. *mBio* 13(3):e00253-22. doi: 10.1128/mbio.00253-22.
- Zhang, W. Y., et H. C. Wu. 1992. « Alterations of the Carboxyl-Terminal Amino Acid Residues of *Escherichia Coli* Lipoprotein Affect the Formation of Murein-Bound Lipoprotein ». *The Journal of Biological Chemistry* 267(27):19560-64.
- Zhang, Yi, Lei Wang, Yunfei Hu, et Changwen Jin. 2014. « Solution Structure of the TatB Component of the Twin-Arginine Translocation System ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1838(7):1881-88. doi: 10.1016/j.bbamem.2014.03.015.
- Zhao, Fen, Yan-Jie Hou, Ying Zhang, Da-Cheng Wang, et De-Feng Li. 2019. « The 1- β -Methyl Group Confers a Lower Affinity of L,D-Transpeptidase LdtMt2 for Ertapenem than for Imipenem ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 510(2):254-60. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.01.082.
- Zhao, Heng, Vaidehi Patel, John D. Helmann, et Tobias Dörr. 2017. « Don't Let Sleeping Dogmas Lie: New Views of Peptidoglycan Synthesis and Its Regulation: New Views on Peptidoglycan Synthesis ». *Molecular Microbiology* 106(6):847-60. doi: 10.1111/mmi.13853.
- Zink, R. T., et A. K. Chatterjee. 1985. « Cloning and Expression in *Escherichia Coli* of Pectinase Genes of *Erwinia Carotovora* Subsp. *Carotovora* ». *Applied and Environmental Microbiology* 49(3):714-17. doi: 10.1128/aem.49.3.714-717.1985.
- Zipperle, G. F., J. W. Ezzell, et R. J. Doyle. 1984. « Glucosamine Substitution and Muramidase Susceptibility in *Bacillus Anthracis* ». *Canadian Journal of Microbiology* 30(5):553-59. doi: 10.1139/m84-083.

Poster

Poster présenté lors des 16èmes Rencontres Plantes-Bactéries qui ont eu lieu du 20 au 24 Mars 2023 au Centre Paul-Langevin, Aussois, France ; et lors du 12th International Congress of Plant Pathology (ICPP) qui s'est tenu du 19 au 25 Août 2023 à la Cité Internationale, Lyon, France.

In *Dickeya dadantii*, the Type II Secretion System (T2SS) is covalently attached to the bacterial cell wall.

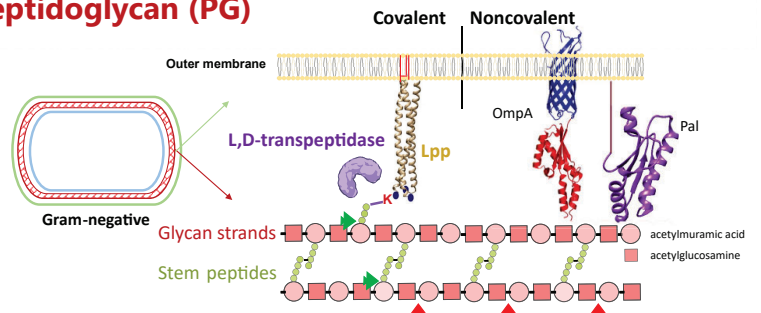


Xavier NICOLAI* & Vladimir SHEVCHIK, MAP UMR 5240 CNRS, MTSB team (xavier.nicolai@univ-lyon1.fr, vladimir.shevchik@insa-lyon.fr)

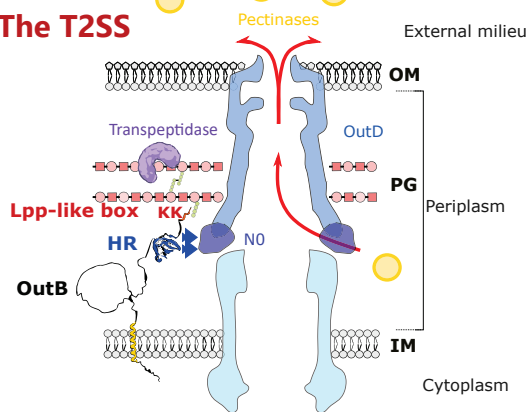
Dickeya dadantii is a broad-spectrum phytopathogenic γ -proteobacterium that provokes soft rot disease in various plants. *D. dadantii* pathogenicity is caused by an arsenal of plant cell-wall degrading enzymes secreted by the Type II Secretion System (T2SS) named Out. Recently, we showed that OutB, an inner membrane T2SS component plays an important scaffolding role and that deletion of outB causes a striking reduction of pectinase secretion and virulence of *D. dadantii* (1). Here, we show that in *D. dadantii*, OutB is covalently attached to the PG. We investigated the molecular mechanisms of OutB attachment to peptidoglycan (PG) and the possible implication of this phenomenon in the virulence of *D. dadantii*. Our results suggest that the covalent attachment of OutB to PG allows a better stabilization of the T2SS in the bacterial cell envelope. Moreover, it shows that the phenomenon of covalent attachment of proteins to PG in proteobacteria could be more widespread and remains largely unexplored.

▶ The covalent attachment of proteins to the peptidoglycan (PG)

Since its discovery in 1969, **Braun's lipoprotein (Lpp)** remained the unique protein known to be **covalently-attached to PG** (2). Its attachment is mediated by enzymes called **L,D-transpeptidases (Ldt)** that perform covalent crosslinking of the **C-terminal lysin** to the stem-peptide. Three genes encode putative L,D-transpeptidases in *D. dadantii*: ABF-0016403, ABF-0020084, ABF-0020070.



▶ The T2SS



The T2SS crosses the whole cell envelope.

OutB, a T2SS component interacting with the secretin, possesses a **C-terminal extension that mimics that of Lpp**.

This led us to hypothesise that OutB could be covalently attached to the PG in *D. dadantii*.

▶ OutB and Lpp sequence

Lpp CSSNAKLDQLSSDVSSLNEK
VSALTSKVDALATDVQAAKDDAARANQRLDNQVRTYK K

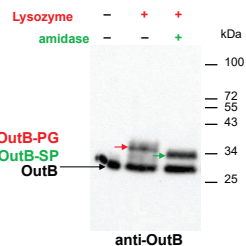
OutB SKPEQTVRTTKK

Is OutB covalently-attached to PG the same way as Lpp?

Material and Methods

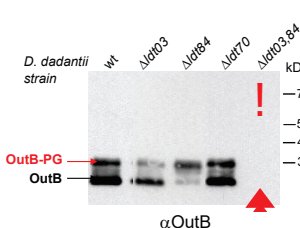
The **PG of *D. dadantii*** cells was extracted by **SDS-boiling** and multiple washes to get rid of uncovalently-bound proteins. Next, the purified PG was digested with **lysozyme** or **amidase** that **respectively digests glycan chains or detaches the stem-peptide from glycan**. The PG samples were then separated on SDS-PAGE and proteins **covalently-attached to the PG were visualized by western-blot**.

▶ OutB is covalently attached to the PG



The digestion of PG by **lysozyme** releases **OutB covalently attached to glycan moieties (OutB-PG)**. The digestion of PG with **amidase** releases **OutB attached to the stem-peptide (OutB-SP)** and causes a shift of OutB-PG bands. These results demonstrate OutB attachment to PG.

▶ By two L,D-transpeptidases, Ldt 03 and 84

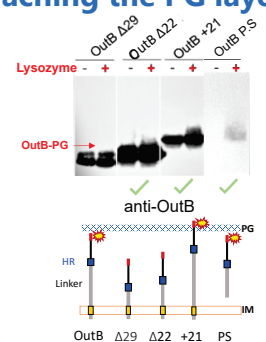


D. dadantii possesses 3 L,D-transpeptidases: Ldt03, 84 and 70. The peptidoglycan of *D. dadantii* ldt mutant strains was digested with **lysozyme** and analysed by western blot. *ltd03* and *ltd84*, display a decreased quantity of covalently-attached OutB to PG (OutB-PG), but this quantity remains the same as wt in a *ltd70* mutant. **No covalently-attached OutB can be visualised in *ltd03,84* mutant**. Thus indicating that **Ldt 03 and 84 are responsible for OutB attachment to PG**.

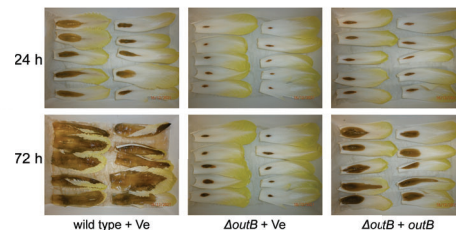
▶ Is OutB length important for reaching the PG layer?

Importance of the length of OutB for its attachment to PG, was assessed by constructing:

- **shorter or longer versions of OutB**, by deletion (-22 or -29) or addition of (+21) residues in the linker region
 - a **periplasmic version of OutB (PS)**, where the IM segment was substituted by cleavable signal peptide.
- These versions were expressed in *D. dadantii* and the PG was digested with lysozyme. Results show that **membrane attachment of OutB is not essential** and that a **minimal length of OutB is required for covalent attachment to PG**.



▶ Effect of OutB on pectinase secretion



OutB is required for type 2 secretion and essential for the full virulence of *D. dadantii*.

▶ Conclusion & Perspectives

OutB is the first inner membrane protein shown to be attached to PG in Gram-negative bacteria.

Covalent attachment of OutB to PG **stabilizes the T2SS**.

Ongoing mass spectrometry will determine the sequence of the stem-peptides attached to OutB.

Remaining biological question:

Are there other covalently-attached proteins to PG in Gram - bacteria?

Résumé

Dickeya dadantii est une γ -protéobactérie phytopathogène à large spectre d'hôte qui provoque la maladie de la pourriture molle chez les végétaux. Elle sécrète des enzymes dégradant la paroi cellulaire végétale par le système de sécrétion de type II (T2SS), appelé Out. Le système Out est un complexe multiprotéique traversant l'enveloppe bactérienne. L'enveloppe des γ -protéobactéries est constituée de deux membranes qui délimitent un espace extracytoplasmique appelé le périplasme. Une couche de peptidoglycane (PG), située dans le périplasme assure la forme de la cellule et préserve les bactéries du stress osmotique. La lipoprotéine de Braun (Lpp) stabilise l'enveloppe en attachant le PG à la membrane externe par une liaison covalente. Jusqu'à récemment, Lpp était le seul exemple connu de protéine couplée covalamment au PG chez les bactéries à Gram-négatif. Dans ce travail de thèse, nous avons montré qu'OutB, un composant du T2SS de *D. dadantii*, est couplée au PG de manière covalente comme Lpp. OutB est ancrée dans la membrane interne et possède une région périplasmique qui stabilise le canal du T2SS. L'extrémité C-terminale d'OutB est très similaire à celle de Lpp et nos études ont démontré qu'elle est couplée au PG par la lysine C-terminale. Contrairement au Lpp, qui est une protéine très abondante et agit comme ancrage de la membrane au PG, OutB est exprimée modérément et utilise le PG comme une matrice pour son propre attachement, et pour l'attachement du système Out à l'enveloppe bactérienne. Afin de déchiffrer le mécanisme moléculaire de ce phénomène, une série de mutagenèses dirigées d'OutB a été réalisée et des variants d'OutB de longueur variée ont été construits. Pour évaluer la quantité de variants d'OutB liés au PG, ce dernier a été purifié et analysé par Western blot. Cette étude a été complétée par la mutagenèse dirigée de Lpp suivie de tests fonctionnels des variants, et de l'analyse de leur couplage au PG. Ainsi, nous avons montré que le motif de couplage au PG de Lpp, appelé Lpp-box, est assez permissif aux substitutions chez *D. dadantii*, et peut permettre l'attachement au PG de protéines assez variées. Nous avons montré que la fusion de la Lpp-box à la protéine périplasmique BlaM a permis l'attachement de cette dernière au PG. Par ailleurs, cette étude a suggéré qu'une pectinase périplasmique, PaeX, qui porte une Lpp-box assez dégénérée, semble également être couplée au PG. Nous avons ensuite montré que deux L,D-transpeptidases de *D. dadantii*, Ldt03 et Ldt84, sont responsables de l'attachement d'OutB et de Lpp au PG. Ldt03 et Ldt84 ne génèrent pas les mêmes profils de liaison de Lpp au PG ce qui suggère que chacune des deux Ldt possède une spécificité enzymatique vis-à-vis de la taille du peptide-tige auquel elles attachent Lpp. Nous avons également montré que les L,D-transpeptidases d'*E. coli* ont une activité croisée sur la Lpp de *D. dadantii*, permettant son couplage au PG, bien que les Lpp-boxes des Lpp de ces bactéries soient dissimilaires. Ces travaux montrent que le phénomène d'attachement covalent des protéines au PG chez les γ -protéobactéries ne se limite pas à Lpp et aux porines de la membrane externe, mais qu'il peut également concerner des protéines de la membrane interne, comme OutB, ou périplasmiques, comme la pectinase PaeX. Il est donc probable que ce phénomène soit encore largement sous-estimé chez les bactéries à Gram-négatif.

Mots-clés : T2SS, peptidoglycane, bactéries à Gram-négatif, enveloppe bactérienne, Lipoprotéine de Braun, L,D-transpeptidase, *Dickeya dadantii*.

Title

Covalent attachment of proteins to the peptidoglycan in the γ -proteobacterium *Dickeya dadantii*: study of a type II secretion system protein, OutB.

Abstract

Dickeya dadantii is a broad-spectrum plant pathogenic γ -proteobacterium that causes soft rot disease. It secretes cell wall degrading enzymes through the type II secretion system (T2SS), called Out. The Out system is a multi-protein complex that crosses the bacterial cell envelope. The cell envelope of γ -proteobacteria is composed of two membranes delimiting an extracytoplasmic compartment called the periplasm that contains a peptidoglycan (PG) layer. The PG provides the cell shape and protects the bacteria from osmotic stress. Braun's lipoprotein (Lpp) stabilizes the bacterial cell envelope by covalent attachment of PG to the outer membrane. Until recently, Lpp was the only known example of a protein covalently attached to the PG in Gram-negative bacteria. In this work, we showed that OutB, a component of the *D. dadantii* T2SS, is covalently attached to the PG, by the same mechanism as Lpp. OutB is anchored in the inner membrane and possess a periplasmic region that stabilizes the T2SS channel. The C-terminus of OutB is very similar to that of Lpp and our studies have shown that it is attached to the PG via its C-terminal lysine. However, unlike the highly abundant Lpp that plays a structural role by anchoring the outer membrane to the PG, OutB is moderately expressed and uses the PG as a scaffold matrix for its own attachment and for the attachment of the Out system to the bacterial cell envelope. In order to decipher the molecular mechanism of this phenomenon, a series of site-directed mutagenesis of OutB were carried out, and OutB length variants were constructed. To assess the quantity of OutB variants bound to the PG, the PG was purified and analyzed by Western blot. This study was completed by site-directed mutagenesis of Lpp, followed by functional assays of the variants, and by the analysis of their attachment to the PG. We showed that in *D. dadantii*, the attachment motif of Lpp to the PG, called Lpp-box, tolerates various amino acid substitutions, and could probably allow the attachment of various proteins to the PG. We showed that the fusion of the Lpp-box to the periplasmic protein BlaM enabled its covalent linking to the PG. Furthermore, this study also suggested that a periplasmic pectinase, PaeX, which carries a rather degenerated Lpp-box, seems also to be attached to the PG. Finally, we showed that two L,D-transpeptidases of *D. dadantii*, Ldt03 and Ldt84, are responsible for the covalent linking of OutB and Lpp to the PG. Ldt03 and Ldt84 did not generate the same binding profiles of Lpp to the PG. This suggests that Ldt03 and Ldt84 have each their own enzymatic specificity with respect to the size of the stem-peptide to which they attach Lpp. Although the Lpp-boxes of Lpp of *E. coli* and *D. dadantii* are dissimilar, we showed that the L,D-transpeptidases of *E. coli* attach Lpp of *D. dadantii* to the PG. Overall, these results show that the covalent attachment of proteins to the PG in γ -proteobacteria is not limited to Lpp and some outer membrane porins. This phenomenon can also involve inner membrane proteins and periplasmic proteins, such as OutB and the pectinase PaeX. It seems therefore likely that this phenomenon is still largely underestimated, and some other proteins covalently attached to PG remain to be discovered in Gram-negative bacteria.

Keywords: T2SS, peptidoglycan, Gram-negative bacteria, bacterial cell envelope, Braun's lipoprotein, L,D-transpeptidase, *Dickeya dadantii*.