



**HAL**  
open science

# Morphogenèse et division bactérienne : une approche multidisciplinaire

Cécile Morlot

► **To cite this version:**

Cécile Morlot. Morphogenèse et division bactérienne : une approche multidisciplinaire . Biologie structurale [q-bio.BM]. Université Grenoble Alpes, 2017. tel-01643070

**HAL Id: tel-01643070**

**<https://hal.univ-grenoble-alpes.fr/tel-01643070>**

Submitted on 21 Nov 2017

**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.

## **Mémoire d'habilitation à diriger les recherches**

Discipline : **Biologie**

Présenté et soutenu le 30 Juin 2017 par

**Cécile MORLOT**

**Groupe Pneumocoque  
Institut de Biologie Structurale  
CNRS (UMR 5075) / CEA / UGA**

Au sein de l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

## **Morphogenèse et division bactérienne : une approche multidisciplinaire**

Composition du jury :

**Dr. Rut Carballido-Lopez**

Directrice de recherche au CNRS, rapportrice

**Dr. Eric Cascales**

Directeur de recherche au CNRS, rapporteur

**Dr. Jean-Michel Jault**

Directeur de recherche au CNRS, rapporteur

**Dr. Andrea Dessen**

Directrice de recherche au CNRS, examinatrice

**Dr. Jean-Pierre Simorre**

Directeur de recherche au CNRS, examinateur





*Merci à tous ceux qui m'ont accompagnée et m'accompagnent dans ma vie scientifique,*

*Merci à tous ceux qui m'ont permis et me permettent de m'en extraire parfois pour profiter de toutes les autres joies de la vie*

*Merci à Cyril qui sait si bien m'accompagner dans ces deux univers,*

*Merci à Enki, Bahia et June qui donnent un sens, de la vie et des sourires à mes images de microbes*



# TABLE DES MATIERES

<b>CURRICULUM VITAE .....</b>	<b>6</b>
Formation.....	8
Activités de Recherche.....	8
Compétences Techniques.....	8
Collaborations Majeures .....	9
Financements .....	9
Résumé des Encadrements et Enseignements .....	9
Expertise scientifique.....	10
Diffusion et Vulgarisation scientifique .....	10
Résumé de la Production scientifique .....	11
<b>ENCADREMENT .....</b>	<b>12</b>
<b>PRODUCTION SCIENTIFIQUE .....</b>	<b>16</b>
Publications .....	18
Communications Orales .....	20
Posters.....	21
<b>TRAVAUX DE RECHERCHE.....</b>	<b>22</b>
<b>I - Synthèse chronologique des travaux de recherche.....</b>	<b>24</b>
<b>II - Développement thématique des activités de recherche .....</b>	<b>29</b>
<b>A. Morphogenèse et division chez <i>S. pneumoniae</i> .....</b>	<b>29</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>29</b>
a. <i>S. pneumoniae</i> , un pathogène humain devenu modèle d'étude de la morphogenèse bactérienne.....	30
b. Synthèse du peptidoglycane : rôle des protéines Mur, PBPs et SEDS .....	32
c. Hydrolyse du peptidoglycane : rôle des hydrolases de la paroi .....	33
d. Les machineries morphogénétiques.....	35
<b>2. Travaux réalisés.....</b>	<b>40</b>
a. Synthèse cytoplasmique du précurseur du PG: structure du complexe MurT-GatD .....	40
b. Assemblage des machineries morphogénétiques: localisation cellulaire à basse résolution .....	42
c. Assemblage des machineries morphogénétiques: localisation cellulaire à haute résolution.....	43
d. Assemblage des machineries morphogénétiques: rôle de la kinase StkP .....	48
e. Hydrolyse ménagée du PG: rôle des hydrolases de la paroi .....	49

<b>B. Division chez <i>E. coli</i></b> .....	<b>54</b>
1. Introduction .....	54
2. Travaux réalisés.....	54
<b>C. Morphogenèse de la spore chez <i>B. subtilis</i></b> .....	<b>56</b>
1. Introduction.....	56
2. Travaux réalisés.....	58
a. Etude fonctionnelle d'un complexe d'hydrolases impliqué dans la morphogenèse de la spore .....	58
b. Etude fonctionnelle du complexe SpoIIIA-SpoIIQ impliqué dans la morphogenèse de la spore.....	59
c. Etude structurale du complexe SpoIIIA-SpoIIQ impliqué dans la morphogenèse de la spore.....	62
<b>PROJET DE RECHERCHE</b> .....	<b>66</b>
<b>I - Préambule</b> .....	<b>68</b>
<b>II - Développement thématique du projet de recherche</b> .....	<b>68</b>
<b>A. Morphogenèse et division chez <i>S. pneumoniae</i></b> .....	<b>68</b>
1. Quels sont les partenaires de FtsZ qui régulent l'architecture granuleuse hétérogène (formation d'amas protéiques) de l'anneau ?.....	69
2. Comment les partenaires de FtsZ régulent-ils l'architecture de l'anneau Z au niveau cellulaire et moléculaire ?.....	71
3. Les amas de FtsZ sont-ils des points d'ancrage pour la machinerie de synthèse du PG ?.....	72
4. Quel est le degré d'indépendance spatiale et temporelle des machineries d'élongation et de division au cours du cycle cellulaire ? Quel est le mécanisme qui régule cette (in)dépendance ?.....	73
<b>B. Morphogenèse de la spore chez <i>B. subtilis</i></b> .....	<b>76</b>
1. Quelle est le degré de similitude structurale entre les anneaux formés par SpoIIAG et ceux formés par EscJ/PrgK dans les T3SS ? .....	76
2. SpoIIAG forme-t-elle des pores dans les membranes ?.....	77
3. La protéine GerM, nécessaire à la localisation de SpoIIAG, est-elle un composant du complexe SpoIIIA-SpoIIQ et forme-t-elle des anneaux ?.....	77
4. Quel est l'architecture globale du complexe SpoIIIA-SpoIIQ ?.....	78
5. Comment s'assemble le complexe SpoIIIA-SpoIIQ dans la cellule ?.....	78
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>82</b>
<b>ANNEXES : PREMIERE PAGE DES ARTICLES PUBLIES</b> .....	<b>92</b>

# ***CURRICULUM VITAE***



## Cécile MORLOT, chercheuse CNRS CR1

Institut de Biologie Structurale - Groupe Pneumocoque  
71, avenue des Martyrs – CS10090  
38000 Grenoble, France  
39 ans - mariée - 3 enfants

Port. +33 (0)6 24 59 20 37  
Fixe. +33 (0)4 57 42 86 55  
[cecile.morlot@ibs.fr](mailto:cecile.morlot@ibs.fr)

### FORMATION

2000-2003 **Doctorat** de *Biologie Cellulaire et Moléculaire*, Université Joseph Fourier, Grenoble  
1995-2000 **Diplôme d'ingénieur** *Génie Biochimique et Alimentaire, Génétique Microbienne*, INSA Toulouse - **DEA Biologie, Santé, Biotechnologies**, filière *Microbiologie*

### ACTIVITES DE RECHERCHE

Depuis 2014 **CR1 CNRS, IBS**, Grenoble, France (T. Vernet). *Etude de la morphogénèse bactérienne.*  
2010-2014 **CR2 CNRS, IBS**, Grenoble, France (T. Vernet). *Etude de la morphogénèse bactérienne.*  
2007-2010 Post-doctorante, **Harvard Medical School**, Boston, USA (D. Rudner). *Intercellular signal transduction during sporulation in B. subtilis.*  
2004-2007 Post-doctorante, **European Molecular Biology Laboratory**, Grenoble, France (S. Cusack). *Neuronal development: structural studies of human SLIT and Robo proteins.* SPINE fellowship.  
2000-2003 Doctorante, **Institut de Biologie Structurale (IBS)**, Grenoble, France (T. Vernet). *Etude structurale de PBP3 et localisation des six 'Penicillin-Binding Proteins' de S. pneumoniae: implication dans la croissance et la division bactérienne.*  
2000 Stagiaire ingénieur, **Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale**, Toulouse, France (J.M. Masson). *Etude des intéines de Pyrococcus abyssi.*  
1999 Stagiaire ingénieur, **PROTEUS**, Nîmes, France. *Expression et purification d'enzymes recombinantes thermophiles.*  
1998 Stagiaire ingénieur, **NESTLE**, University of Birmingham, UK.

### ARRETS DE TRAVAIL

2009 4 mois de congés maternité pour naissance unique  
2011 8 mois de congés maternité pour naissance gémellaire

### COMPETENCES TECHNIQUES

Bio. moléculaire : Clonage, mutagenèse dirigée  
Biochimie: Purification et purification de protéines recombinantes chez *E. coli*. Caractérisation d'interactions protéines-protéines: immunoprecipitations, "pull-down", SPR, ELISA, thermophorèse. Caractérisations enzymatiques  
Bio. structurale: Cristallisation, collectes synchrotron, traitement de données, phasage, affinement, validation de structures  
Microbiologie: Manipulations génétiques et cultures de *B. subtilis* et de *S. pneumoniae*  
Imagerie cellulaire: Microscopie en fluorescence conventionnelle et super-résolue (PALM)  
Langues: Anglais (courant), espagnol (courant)

## COLLABORATIONS MAJEURES

Depuis 2015	Y. Brun, Indiana University, Bloomington, USA. "Structural studies of <i>C. crescentus</i> morphogenesis".
Depuis 2013	D. Rudner, Harvard Medical School, Boston, USA. "Structural studies of <i>B. subtilis</i> spore morphogenesis". (Rodrigues et al., 2016a).
Depuis 2012	C. Grangeasse, Molecular Microbiology and Structural Biochemistry (MMSB), Lyon. "Study of <i>S. pneumoniae</i> morphogenesis". (Morlot et al., 2013; Nourikyan et al., 2015).
Depuis 2010	T. Bernhardt, Harvard Medical School, Boston, USA: "Structural studies of <i>E. coli</i> division". (Peters et al., 2013).
Depuis 2010	D. Bourgeois, Pixel team, IBS, Grenoble: "Development of PALM in <i>S. pneumoniae</i> ". (Jacq et al., 2015).

## FINANCEMENTS

2017-2021	Financement NIH. Collab. avec Y. Brun, coordinatrice du projet côté France. ~200 k\$. "Control of bacterial morphology and differentiation".
2016-2020	ANR-16-CE11-0016 DIVinHD. Coordinatrice. ~358 k€. "Super-resolution imaging of bacterial division".
2016	Financement interne IBS. Coordinator. 15 k€. "Structural study of the EnvC-AmiB complex involved in bacterial division".
2015	Bourse d'échange Chateaubriand (Visite R. Yunck, 6 mois, thèse soutenue le 21 Avril 2016 sous la supervision de T. Bernhardt, HMS, Boston). Coordinatrice. 10 k€. "Structural study of a protein complex involved in bacterial division".
2014-2018	ANR-14-CE14-0003 ORBIMP. Collab. avec A. Zapun, IBS, Grenoble. ~298 k€. "Outsmarting Resistance to $\beta$ -lactams in Meningococcus and Pneumococcus".
2014-2018	IMMI-INSERM / Astra-Zeneca. Collab. avec A. Zapun, IBS, Grenoble. ~154 k€. "Peptidoglycan amidotransferase inhibitors".
2012-2015	Labex Gral. Coordinatrice. ~130 k€ pour financer la thèse de M. Jacq. "Morphogenesis of <i>S. pneumoniae</i> ".
2012-2014	ANR-2011-BSV5-012-01 NOBLEACH. Collab. avec D. Bourgeois, IBS, Grenoble. ~83 k€ pour notre groupe.
2012	Fond d'intervention UJF (pôle CSVSB). Coordinatrice. 10 k€. "Development of PALM in <i>S. pneumoniae</i> ".

## RESUME DES ENCADREMENTS ET ENSEIGNEMENTS

Depuis 2015	Co-supervision de la thèse de C. Arthaud (co-dir. avec T. Vernet)
Depuis 2015	Membre du comité de thèse de C. Mercy (Dir. C. Grangeasse, IBCP, Lyon)
2015	Membre du comité de thèse de C. Tomé (Dir. D. Housset, IBS, Grenoble)
2012-2016	Co-supervision de la thèse de M. Jacq (co-dir. avec A.M. DI Guilmi), soutenue le 18 Avril 2016
2012-2013	Co-supervision du post-doctorat de X. Henry
Depuis 2010	Divers enseignements lors de workshops, 1 cours pour étudiants en médecine
Depuis 2000	Supervision des stages de 6 étudiants niveau master, 5 étudiants niveau licence, 2 étudiants techniciens, 2 étudiante en thèse dans le cadre de programmes d'été.

## EXPERTISE SCIENTIFIQUE

- Depuis 2013 Evaluation de manuscrits pour publication dans les journaux *Molecular Microbiology*, *MicrobiologyOpen*, *mBio*, *Journal of Bacteriology* et *Scientific Reports*
- 2013 Evaluation d'un dossier de candidature pour un financement par le *Polish National Science Center*

## DIFFUSION ET VULGARISATION SCIENTIFIQUE

- 2015, 2017 Membre organisateur du **FluoDay**, journée de la microscopie Grenobloise, ~100 participants, Grenoble.
- Nov. 2016 **Lettre scientifique** de l'IBS : couverture et zoom sur la publication de l'étude structurale des anneaux formés par SpoIIIAG (Rodrigues, Henry et al., *PNAS*, 2016). "Un canal protéique entre la cellule mère et la préspore".
- 2016-2017 Suite aux "Ateliers microbes" réalisés dans les classes de maternelle, participation à l'élaboration d'une histoire pour enfants autour des microbes ("**La Sorcière Microba**", histoire créée par l'institutrice Naïma Guerziz, ma contribution a été de rédiger le texte de présentation vulgarisée des microbes).  
<http://editionsthot.com/catalogue/livres-en-souscription/la-sorciere-microba>
- Sept. 2015 **Lettre scientifique** de l'IBS : zoom sur la publication de la nanostructure de FtsZ chez *S. pneumoniae* (Jacq et al., *mBio*, 2015). "Première étude PALM chez un coque à Gram positif".
- Fév. 2015 **Lettre scientifique** de l'IBS : couverture avec photo de cristaux de SpmX en forme de crayon.
- Depuis 2013 Introduction à la microbiologie pour des classes de maternelle et primaire sous la forme d'"**Ateliers Microbes**" incluant 6 sessions : 1. présentation du métier de chercheur, 2. découverte de bactéries pathogènes et commensales, 3. notions sur la division bactérienne, 4-5. travaux dirigés (dessins, modelages de formes microbiennes, exercices de corrélations bactéries-niche écologique-outils associés (antibiotiques, alimentation, ...)), 6. Travaux expérimentaux (cultures sur boîtes de Pétri).
- Depuis 2013 Opération "**Scientifique toi aussi**" (CEA Grenoble), rencontre avec des élèves de 1ère et terminale scientifique pour présenter parcours professionnel et métier de chercheur.
- Février 2014 Présentation de mes travaux à la **délégation ministérielle** lors de la cérémonie d'inauguration du nouveau bâtiment IBS. "Aux frontières de l'imagerie cellulaire".
- 2014 Membre organisateur du **GTBio2014** (Congrès de l'Association Française de Cristallographie), 170 participants, Grenoble.
- Fév. 2014 Réalisation d'un « **Clip métier** » CEA sur le métier de chercheur utilisant la cristallographie aux rayons X.  
<http://www.cea.fr/multimedia/Pages/videos/activites-du-cea/projet-labo-installation/cristallographie-des-proteines.aspx>
- Octobre 2013 Présentation des applications de la microscopie super-résolue à un groupe de journalistes de la European Union of Science Journalists' Association (**EUSJA**)
- Septembre 2013 Présentation de mes travaux lors de la réunion des chefs d'instituts DSV, Seyssins. "Mécanismes de régulation de la morphogénèse du pneumocoque".
- Octobre 2010 Intervenant pour la **fête de la science**: Visite du laboratoire et vulgarisation de mes travaux de recherche pour les classes de CM2.

## RESUME DE LA PRODUCTION SCIENTIFIQUE

- 10 structures déposées dans la PDB
- 1 carte de microscopie électronique déposée dans la EMDB
- 27 communications orales (dont 5 en tant qu'oratrice invitée depuis 2015) lors de séminaires/congrès/colloques nationaux et internationaux
- 12 interventions de vulgarisation scientifique depuis 2011
- 22 publications parues dans des journaux à comité de lecture :
  - Bonnet, ..., **Morlot**, et al. (2017). *Sci. Rep. Manuscript sous presse*
  - Maréchal, ..., **Morlot**, et al. (2016). *BMC microbiology* 16(1):239
  - Zapun, **Morlot**, Taha (2016). *Antibiotics* 5(4). pii:E35
  - Rodrigues, ..., **Morlot** (2016). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113(41):11585 [↗](#)
  - Nourikyan, ..., **Morlot**, et al. (2015). *PLoS Genet.* 11(9):e1005518
  - Jacq, ..., **Morlot** (2015). *mBio* 6(4). pii: e01108-15 [↗](#)
  - Li, ..., **Morlot**, et al. (2015). *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 71(Pt 6):1373
  - Philippe, ..., **Morlot**, et al. (2014). *Antimicrob. Agents. Chemother.* 59(1):609
  - Duan, ..., **Morlot**, et al. (2013). *J. Am. Chem. Soc.* 135(42):15841
  - **Morlot**, et al. (2013). *Mol Microbiol.* 90(1):88
  - Peters\*, **Morlot\***, et al. (2013). *Mol. Microbiol.* 89(4):690 [↗](#)
  - **Morlot**, et al. (2010). *Genes Dev.* 24(4):411
  - Doan\*, **Morlot\***, et al. (2009). *PLoS Genet.* 5(7): e1000566.
  - **Morlot**, et al. (2007). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104:14923
  - **Morlot**, et al. (2007). *Acta Cryst. D* 63:961
  - **Morlot**, et al. (2007). *Acta Cryst. F* 63:689
  - **Morlot**, et al. (2005). *J. Biol. Chem.* 280:15984
  - Noirclerc-Savoie, ..., **Morlot**, et al. (2005). *Mol. Microbiol.* 55:413
  - **Morlot**, et al. (2004). *Mol. Microbiol.* 51:1641
  - **Morlot**, et al. (2003). *Mol. Microbiol.* 50:845
  - Noirclerc-Savoie, **Morlot**, et al. (2003). *Prot. Expr. and Purif.* 30:18
  - Saves, **Morlot**, et al. (2002). *Nucleic Acids Res.* 30:4158

\* *Equal contribution*

[↗](#) **Corresponding authorship pour C. Morlot**

# **ENCADREMENT**



## **Techniciens**

- Depuis 2012 Laure Bellard, technicienne CEA permanente au laboratoire. "Structural studies of bacterial morphogenesis". 50%.  
(Rodrigues et al., 2016a; Jacq et al., manuscrit en prépauration).
- 2015 (12 mois) Charlène Theveduide, technicienne en CDD financée par le contrat ANR ORBIMP (Collab. A. Zapun). "Etude structurale du complexe MurT-GatD impliqué dans la synthèse du peptidoglycane chez *S. pneumoniae*".

## **Etudiants niveau technicien (BTS, L3pro)**

- Juin-Oct 2012 (5 mois) Mounci Kedari, stagiaire **BTS** (Louise Michel, Grenoble). "Production et purification des amidases de la paroi de *E. coli* et de leurs activateurs". 100%.
- Mars 2013-Jan 2014 (11 mois) Jennifer Galindo, stagiaire **L3 pro** en alternance (Université Grenoble Alpes). "Structural and functional studies of MurT-GatD and Pmp23, two proteins involved in *S. pneumoniae* cell wall synthesis". 50%.

## **Etudiants niveau license (L1, L2, L3)**

- Juin-Juil 2016 (8 semaines) Elda Bauda, stagiaire **L1** (Université Grenoble Alpes). "Production et purification de EzrA, une protéine majeure de la division chez *S. pneumoniae*". 50%.
- Juin-Août 2013 (3 mois) Christopher Arthaud, stagiaire **L3** (Université Grenoble Alpes). "Localisation cellulaire du système de sécrétion Sec et des sortases chez *S. pneumoniae*". 100%.
- Juin-Août 2012 (3 mois) Sara El Kennani, stagiaire **L2** (Université Joseph Fourier, Grenoble). "Localisation cellulaire de protéines Fts et Penicillin-Binding Proteins dans une souche de pneumocoque déletée de l'hydrolase de la paroi Pmp23". 100%.
- Jan-Juin 2002 (6 mois) Sylvain Maunier, stagiaire **L3** (Université Catholique de Lyon). "Production de protéines Fts et PBPs de *S. pneumoniae* et purification des anticorps correspondants". 100%.

## **Etudiants niveau M1**

- Avril-Mai 2016 (8 semaines) Alicia Kerkache, stagiaire **M1** (Université Grenoble Alpes). "Production et purification de EzrA, une protéine majeure de la division chez *S. pneumoniae*". 50%.
- Avril-Juil 2014 (4 mois) Claire Rousset, stagiaire **M1** (Université Grenoble Alpes). "Structural studies of SpoIIIAG, a protein involved in the sporulation of *B. subtilis*". 100%.
- Juin-Août 2011 (3 mois) Guillaume Cerardi, stagiaire **M1** (UFR de pharmacie, Grenoble). "Localization of Penicillin-Binding Proteins in *S. pneumoniae* by fluorescence microscopy". 50%.

## **Etudiants niveau M2 et ingénieur**

- Jan-Juil 2015 (6 mois) Christopher Arthaud, stagiaire **M2** (Université Grenoble Alpes). "Morphogenesis of *S. pneumoniae*". 100%.  
(Jacq et al., manuscrit en préparation)

- Juin-Août 2010 (3 mois) Nina Messori, stagiaire fin d'étude **ingénieur** (INP Phelma, Grenoble). "Production, purification et test d'interactions entre des protéines recombinantes impliquée dans la morphogénèse du pneumocoque". 100%.
- Jan-Juin 2005 (6 mois) Isma Hachi, stagiaire **M2** (Université Joseph Fourier, Grenoble). 20%.

### Doctorants

- Depuis Octobre 2015 Christopher Arthaud, **financement ARC 1 "Santé" (Région Rhône-Alpes)**. "Etude de la division chez *S. pneumoniae*". Co-direction avec T. Vernet mais encadrement réel à 100%.  
(Jacq et al., manuscrit en préparation)
- Oct. 2012- Avril 2016 (3 ans, 6 mois) Maxime Jacq, **financement Labex GRAL**. "Etude de la morphogénèse et de la division chez *S. pneumoniae*". Co-direction avec A.M. Di Guilmi mais encadrement réel à 100%.  
(Morlot et al., 2013 ; Jacq et al., 2015 ; Jacq et al., manuscrit en préparation)
- Avril-Oct 2015 (6 mois) Rachel Yunck, **financement fondation Chateaubriand**. Doctorante américaine à la Harvard Medical School (Boston, USA) (supervision : T. Bernhardt). "Structural studies of *E. coli* division". 100% pendant son séjour de 6 mois dans le groupe PG.
- Mai-Juil 2014 (2 mois) Courtnee Bell, **financement GIANT International Internship Programme**. Doctorante américaine à la Alabama State University (Montgomery, USA). "Study of the genetic variability of the cell wall hydrolase Pmp23 in *S. pneumoniae* clinical isolates resistant to  $\beta$ -lactams". 100% pendant son séjour de 2 mois dans le groupe PG.

### Post-doctorants

- 2013-2014 (12 mois) Xavier Henry, **financement interne groupe PG**. "Structural studies of a novel secretion system involved in *B. subtilis* sporulation". 25%.  
(Rodrigues, Henry et al., 2016)

### Participation à des comités de thèses

- Depuis 2015 Chryslène Mercy. Doctorante au MMSB, Lyon. Direction de thèse: C. Grangeasse. "Rôle de la tyrosine-kinase CpsD dans la coordination du cycle cellulaire du pneumocoque et la production de la capsule polysaccharidique". Présidente du comité de thèse.
- 2015 Catarina Tomé. Doctorante à l'IBS, Grenoble. Direction de thèse : D. Housset et J.M. Jault. "Structural and functional studies of the bacterial GTPase EngA to identify new antibiotic compounds". Membre du comité de thèse.
- 2010 Vincent Marty. Doctorant à l'IBS, Grenoble. Direction de thèse : B. Franzetti. "Adaptation de l'Archaea halophile *Halobacterium salinarum* aux stress environnementaux : mécanismes de survie et rôle de la protéolyse intracellulaire". Membre du comité de thèse.

# **PRODUCTION SCIENTIFIQUE**



**En preparation/revision**

- Bonnet, Durmort, Campo, Mortier, VanNieuwenhze, Brun, Arthaud, Jacq, **Morlot**, Schoehn, Gallet, Moriscot, Vernet, Di Guilmi. Peptidoglycan *O*-acetylation is functionally related to cell division in *Streptococcus pneumoniae*. *Manuscript en préparation*
- Jacq, Arthaud, Manuse, Mercy, Bellard, Peters, Gallet, Galindo, Doan, Vollmer, Brun, VanNieuwenhze, Di Guilmi, Vernet, Grangeasse, **Morlot**. The cell wall hydrolase Pmp23 is important for assembly and stability of the division ring in *Streptococcus pneumoniae*. *En revision dans mBio* [↗](#)

**2017**

- Bonnet, Cartannaz, Tourcier, Contreras-Martel, Kleman, **Morlot**, Vernet, Di Guilmi (2017). Autocatalytic association of proteins by covalent bond formation: a Bio Molecular Welding toolbox derived from a bacterial adhesin. *Sci. Rep. Manuscript sous presse*

**2016**

- Maréchal, Amoroso, **Morlot**, Vernet, Coyette, Joris (2016). *Enterococcus hirae* LcpA (Psr), a new peptidoglycan-binding protein localized at the division site. *BMC microbiology* 16(1):239
- Zapun, **Morlot**, Taha (2016). Resistance to  $\beta$ -lactams in *Neisseria* ssp due to chromosomally encoded Penicillin-Binding Proteins. *Antibiotics* 5(4). pii:E35
- Rodrigues\*, Henry\*, Neumann, Kurauskas, Bellard, Fichou, Schanda, Schoehn, Rudner, **Morlot** (2016). A ring-shaped conduit connects the mother cell and forespore during sporulation in *B. subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113(41):11585 [↗](#)

**2015**

- Nourikyan, Kjos, Mercy, Cluzel, **Morlot**, Noirot-Gros, Guiral, Lavergne, Veening, Grangeasse (2015). Autophosphorylation of the bacterial Tyrosine-kinase CpsD connects capsule synthesis with the cell cycle in *S. pneumoniae*. *PLoS Genet.* 11(9):e1005518
- Jacq, Adam, Bourgeois, Moriscot, Di Guilmi, Vernet, **Morlot** (2015). Remodeling of the Z-ring nanostructure during the *S. pneumoniae* cell cycle revealed by PhotoActivated Localization Microscopy. *mBio* 6(4). pii: e01108-15 [↗](#)
- Li, Cheng, **Morlot**, Bai, Jiang, Wang, Roper, Vernet, Dong, Chen, Zhou (2015). Full-length structure of the major autolysin LytA. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 71(Pt 6):1373

**2014**

- Philippe, Gallet, **Morlot**, Denapaite, Hakenbeck, Chen, Vernet, Zapun (2014). Mechanism of  $\beta$ -lactam action in *S. pneumoniae*: the piperacillin paradox. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 59(1):609

**2013**

- Duan, Adam, Byrdin, Ridard, Kieffer-Jaquinod, **Morlot**, Arcizet, Demachy, Bourgeois (2013). Structural evidence for a two-regime photobleaching mechanism in a reversibly switchable fluorescent protein. *J. Am. Chem. Soc.* 135(42):15841
- **Morlot**, Bayle, Jacq, Fleurie, Tourcier, Galisson, Vernet, Grangeasse, Di Guilmi (2013). Interaction of Penicillin-Binding Protein 2x and Ser/Thr protein kinase StkP, two key players in *S. pneumoniae* R6 morphogenesis. *Mol Microbiol.* 90(1):88
- Peters\*, **Morlot**\*, Yang, Uehara, Vernet, Bernhardt (2013). Structure-function analysis of the LytM domain of EnvC, an activator of cell wall remodeling at the *E. coli* division site. *Mol. Microbiol.* 89(4):690 [↗](#)

## 2010

- **Morlot**, Uehara, Marquis, Bernhardt, Rudner (2010). A highly coordinated cell wall degradation machine governs spore morphogenesis in *B. subtilis*. *Genes Dev.* 24(4):411

## 2009

- Doan\*, **Morlot\***, Meisner, Serrano, Henriques, Moran, Rudner (2009). Novel secretion apparatus maintains spore integrity and developmental gene expression in *B. subtilis*. *PLoS Genet.* 5(7): e1000566.

## 2007

- **Morlot**, Thielens, Ravelli, Hemrika, Romijn, Gros, Cusack, McCarthy (2007). Structural insights into the Slit-Robo complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104:14923
- **Morlot**, Hemrika, Romijn, Gros, Cusack, McCarthy (2007). Production of Slit2 LRR domains in mammalian cells for structural studies and the structure of human Slit2 domain 3. *Acta Cryst. D* 63:961
- **Morlot**, Hemrika, Romijn, Gros, Cusack, McCarthy (2007). Cloning, expression, crystallization and preliminary X-ray analysis of the first two Ig domains from human roundabout 1 (Robo1). *Acta Cryst. F* 63:689

## 2005

- **Morlot**, Pernot, Le Gouellec, Di Guilmi, Vernet, Dideberg, Dessen (2005). Crystal structure of the peptidoglycan synthesis regulatory factor PBP 3 from *S. pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* 280:15984
- Noirclerc-Savoie, Le Gouellec, **Morlot**, Dideberg, Vernet, Zapun (2005). In vitro reconstitution of a trimeric complex of DivIB, DivIC and FtsL, and their transient co-localization at the division site in *S. pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 55:413

## 2004

- **Morlot**, Noirclerc-Savoie, Zapun, Dideberg, Vernet (2004). The D,D-carboxypeptidase PBP3 organizes the division process in *S. pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 51:1641

## 2003

- **Morlot**, Zapun, Dideberg, Vernet (2003). Growth and division of *S. pneumoniae*: localization of the high molecular weight penicillin-binding proteins during the cell cycle. *Mol. Microbiol.* 50:845
- Noirclerc-Savoie, **Morlot**, Vernet, Zapun (2003). Expression and purification of FtsW and RodA from *S. pneumoniae*, two membrane proteins involved in cell division and cell growth, respectively. *Prot. Expr. and Purif.* 30:18

## 2002

- Saves, **Morlot**, Thion, Rolland, Diétrich, Masson (2002). Investigating the endonuclease activity of four *P. abyssi* inteins. *Nucleic Acids Res.* 30:4158

\* *Equal contribution*

### **✉ Corresponding authorship for C. Morlot**

- **10 structures cristallographiques** déposées dans la PDB: 4LJB (IrisFP), 4LJC (IrisFP), 4LJD (IrisFP), 4BH5 (EnvC), 2V70 (LRR3-Slit2), 2V9Q (Ig1\_Ig2-Robo1), 2V9R (Ig1\_Ig2-Robot1), 2V9S (LRR2\_Slit2), 2V9T (Ig1-Robo1\_LRR2\_Slit2), 1XP4 (PBP3).
- **1 carte de microscopie électronique** déposée dans la EMDB: EMD-4072 (SpoIIIAG)

- **17ème rencontre G-RREMI**, 24 mars 2016, Grenoble, France. Jacq, Arthaud, Manuse, Peters, Vollmer, Bellard, Brun, VanNieuwenhze, Di Guilmi, Vernet, Grangeasse, Morlot. "A new connection between cell wall metabolism and cell division in *S. pneumoniae*".
- 📄 **6<sup>th</sup> Single Molecule Localization Microscopy Symposium**, 28-30 Août 2016, Lausanne, Switzerland. Jacq, Adam, Bourgeois, Vernet, Morlot. "Remodeling of the Z-ring nanostructure during the *S. pneumoniae* cell cycle revealed by PALM".
- **EMBO workshop "Bacterial cell division: orchestrating the ring cycle"**, 14-17 Sept 2016, Prague, République Tchèque. Jacq, Adam, Bourgeois, Vernet, Morlot. "Remodeling of the division ring nanostructure during *S. pneumoniae* cell cycle revealed by super-resolution microscopy (PALM)".
- **Séminaire BIG, Laboratoire BCI, équipe "Pathogénie bactérienne et réponse cellulaire"**, 24 Mai 2016, Grenoble. Rodrigues, Henry, Neumann, Fichou, Schanda, Schoehn, Rudner, Morlot. "A channel displaying homology with Type III Secretion Systems and flagella connects mother cell and forespore during sporulation in *B. subtilis*".
- 📄 **Séminaire IBCP**, 28 Septembre 2015, Lyon. Jacq, Adam, Bourgeois, Vernet, Morlot. "Remodeling of the division ring nanostructure during the *S. pneumoniae* cell cycle revealed by superresolution microscopy".
- 📄 **6<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists**, 7-11 Juin 2015, Maastricht, The Netherlands. Jacq, Adam, Bourgeois, Vernet, Morlot. "Remodeling of the Z-ring nanostructure during the *S. pneumoniae* cell cycle revealed by PALM". Canceled for major family problem.
- 📄 **2<sup>nd</sup> FluoDay symposium**, 18 Juin 2015, Grenoble. Jacq, Adam, Bourgeois, Vernet, Morlot. "Application of super-resolution techniques to microbiology". Canceled for major family problem.
- **1<sup>st</sup> FluoDay symposium**, 17 Avril 2014, Grenoble. Jacq, Adam, Bourgeois, Vernet, Morlot. "Remodeling of the Z-ring nanostructure during *S. pneumoniae* cell cycle revealed by PALM".
- **Symposium 48H GRAL**, 7-8 Avril 2014, Autrans. Jacq, Adam, Bourgeois, Vernet, Morlot. "The PALM nanostructure of FtsZ along the cell cycle of a pathogenic coccus".
- **7<sup>th</sup> International Conference on Gram-positive Microorganisms**, 23-27 juin 2013, Montecatini Terme, Italie. Morlot, Bayle, Jacq, Di Guilmi. "Interaction of Penicillin-Binding Protein 2x and Ser/Thr protein kinase StkP, two key players in *S. pneumoniae* morphogenesis".
- Colloque Médical du Jeudi (UFR Médecine & Pharmacie), 20 Juin 2013, Grenoble. Morlot. "Les protéines de liaison à la pénicilline du pneumocoque : résistance de la forme, forme de la résistance".
- **EUR-INTAFAR meeting**, 26-27 Nov 2012, Utrecht, The Netherlands. Morlot, Jacq, Adam, Bourgeois, Vernet. "Dynamics of *S. pneumoniae* morphogenetic machineries during the cell cycle using super-resolution microscopy (PALM)".
- **Colloquium on the pneumococcus**, 19-20 Juin 2012, Grenoble. Morlot. "Functional and structural studies of *S. pneumoniae* morphogenesis".
- **Séminaire iRTSV (CEA)**, 2012 Grenoble. Morlot. "Dynamics of *S. pneumoniae* morphogenetic machineries during the cell cycle, using super-resolution microscopy (PALM)".
- **Séminaire IBS**, 2012 Grenoble. Morlot. "Structural and functional studies of *S. pneumoniae* morphogenesis".
- **Séminaire IBS**, 2011, Grenoble. "A highly coordinated cell wall degradation machine governs spore morphogenesis in *B. subtilis*".
- **Séminaire IBS**, 2008, Grenoble. Morlot. "A new membrane complex is involved in intercellular communication during sporulation in *B. subtilis*".
- **Spine2-Complexes meeting**, 2007, Paris. Morlot, Ravelli, Cusack, McCarthy. "2.5 Å crystal structure of the Ig1 and Ig2 domains from the human Slit receptor Robo 1".

- **Séminaire Harvard Medical School**, 2006, Boston, USA. Morlot. "From bacterial division to neuron growth: functional and structural studies of potential therapeutical targets".
- **Séminaire EMBL**, 2003, Grenoble. Morlot. "Growth and division of *S. pneumoniae*: cellular localization of the Penicillin-Binding Proteins during cell cycle".

 **Attendance as an invited speaker.**

## POSTERS

- **Colloque Fts**, 14-16 Mai 2014, Amsterdam, The Netherlands. "The PALM nanostructure of FtsZ along the cell cycle of a pathogenic coccus".
- **Gordon Conference "Bacterial Cell Surfaces"**, 22-27 Juin 2014, Boston, USA. "The PALM nanostructure of FtsZ along the cell cycle of a pathogenic coccus".
- **Groupement de Recherche GdR3334**, réunion plénière, 29 Nov-3 Déc. 2010, Isle-sur-la-Sorgue. "Interaction of Penicillin-Binding Protein 2x and Ser/Thr protein kinase StkP, two key players in *S. pneumoniae* morphogenesis".
- **ASM Prokaryotic Development**, 2009, Cambridge, USA. "A highly coordinated cell wall degradation machine governs spore morphogenesis in *B. subtilis*".
- **Meeting Spine2-Complexes**, 2007, Paris. "2.5 Å crystal structure of the Ig1 and Ig2 domains from the human Slit receptor Robo 1".
- **Keystone Symposia international congress of Innate Immunity**, 2006, Banff, Canada.
- **Xth International congress of bacteriology and applied microbiology**, 2002, Paris. "Growth and division of *S. pneumoniae*: cellular localization of the Penicillin-Binding Proteins during cell cycle".

# **TRAVAUX DE RECHERCHE**



## I - Synthèse chronologique des travaux de recherche

Depuis mon doctorat, mes travaux de recherche ont essentiellement porté sur l'étude structurale et fonctionnelle de larges complexes protéiques impliqués dans les mécanismes de morphogénèse et de division bactérienne et constituant des cibles thérapeutiques potentielles. Pour comprendre les processus étudiés d'un point de vue fonctionnel et structural, je me suis formée à des techniques complémentaires dans les domaines de la microbiologie cellulaire (génétique microbienne, cultures bactériennes), de la biologie moléculaire et de la biochimie (interactions protéine-protéine, enzymologie), de l'imagerie cellulaire (microscopie en fluorescence à basse et haute résolution) et de la biologie structurale (cristallographie des rayons X).

J'ai choisi pour mon doctorat d'étudier les mécanismes de la morphogénèse et de la division bactérienne chez *Streptococcus pneumoniae* sous la supervision de Thierry Vernet à l'Institut de Biologie Structurale à Grenoble. Ce choix a d'abord été motivé par le fait que *S. pneumoniae* est un important pathogène humain, responsable de plus de 1.5 millions de morts par an dans le monde et présentant une résistance aux antibiotiques inquiétante. D'autre part, *S. pneumoniae* appartient à la famille morphologique des ovocoques, intermédiaire entre la forme sphérique des coques et la forme en bâtonnet des bacilles, et qui compte de nombreux autres pathogènes humains tels que les entérocoques et les streptocoques. L'étude des processus vitaux de morphogénèse et de division bactérienne chez les ovocoques est donc une source riche d'informations utiles au développement de nouvelles stratégies antibactériennes.

Durant mon doctorat, j'ai réalisé la première caractérisation du comportement dynamique des complexes de croissance et de division au cours du cycle cellulaire de *S. pneumoniae*. J'ai localisé par microscopie en fluorescence le répertoire complet de ses "**Penicillin-Binding Proteins**" (PBPs), enzymes de synthèse du composant majoritaire de la paroi bactérienne, le **peptidoglycane (PG)**. J'ai par ailleurs résolu la structure cristallographique de l'une d'elle, la D,D-carboxypeptidase PBP3, qui est impliquée dans la maturation de la paroi. Mes travaux ont abouti à la publication de cinq articles dans des revues à comité de lecture et un dépôt de coordonnées structurales à la Protein Data Bank (PDB) (Morlot et al., 2003, 2004, 2005, Noirclerc-Savoie et al., 2003, 2005).

À la suite de mon travail de thèse, désirant compléter ma formation en cristallographie, j'ai intégré le laboratoire de Stephen Cusack à l'EMBL (European Molecular Biology Laboratory) de Grenoble. Ce laboratoire combine une excellente expertise en cristallographie, la proximité de la source de rayonnement synchrotron de l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) et un environnement international enrichissant. J'ai travaillé pendant trois ans sur un projet nouveau pour le laboratoire, portant sur l'étude structurale des protéines humaines Slit et Roundabout (Robo), un couple ligand-récepteur essentiel au développement du système nerveux. J'ai résolu la structure cristallographique des protéines Slit et Robo, ainsi que celle du complexe Slit-Robo. Ces travaux ont donné lieu à trois

publications dans des revues à comité de lecture et cinq dépôts de coordonnées structurales à la PDB (Morlot et al., 2007a, 2007b, 2007c). Portant toutefois sur une thématique très différente de tous mes autres projets de recherche, j'ai décidé de ne pas les décrire dans ce manuscrit. Les publications relatives à ces travaux pourront être consultées en annexe.

Après cette première expérience post-doctorale, j'ai voulu rétablir un équilibre entre mes compétences en biologie structurale et fonctionnelle, et surtout revenir à l'étude de processus fondamentaux de la cellule bactérienne. J'ai donc choisi d'intégrer le laboratoire de David Rudner à l'école de médecine de Harvard (Harvard Medical School, HMS) à Boston aux Etats-Unis pour travailler sur des complexes protéiques membranaires impliqués dans la morphogénèse de la spore chez *Bacillus subtilis*. Mon premier projet a consisté à étudier un nouveau système de sécrétion composé de neuf protéines (SpoIIQ et SpoIIIAA-AH). En duo avec mon collègue Thierry Doan, j'ai montré que ces protéines forment un complexe membranaire nécessaire au maintien de l'intégrité et à la maturation de la préspore chez *B. subtilis*. Mon deuxième projet a consisté à caractériser l'activité enzymatique d'un couple d'hydrolases de la paroi (SpoIIP et SpoIID) nécessaire au développement de la préspore chez *B. subtilis*. Il a été réalisé en collaboration avec le laboratoire de Thomas Bernhardt (HMS, Boston), qui étudie la division cellulaire chez *Escherichia coli* et qui maîtrisait la technique d'enzymologie nécessaire à la réalisation de ce projet. J'ai montré que la coordination des activités hydrolytiques de SpoIIP et SpoIID permet une dégradation séquentielle du PG lors de la sporulation, suggérant un modèle dans lequel la machinerie SpoIIP-SpoIID conduirait la migration de la membrane autour de la préspore. Ces deux projets ont fait l'objet de deux publications dans des revues à comité de lecture (Doan et al., 2009; Morlot et al., 2010).

C'est à l'issue de ce stage post-doctoral que j'ai été recrutée en tant que chargée de recherche par le CNRS pour étudier les mécanismes de la division et de la morphogénèse bactérienne au sein du Groupe Pneumocoque à l'Institut de Biologie Structurale à Grenoble. Tous les projets que j'ai réalisés ou supervisés depuis mon arrivée au laboratoire en Janvier 2010 ont visé à décrire les mécanismes d'assemblage des machineries morphogénétiques bactériennes. Mes projets sont majoritairement centrés sur *S. pneumoniae* mais mon expérience post-doctorale à Boston a stimulé à mon retour en France des collaborations avec les groupes de D. Rudner et T. Bernhardt (HMS, Boston) pour réaliser l'étude structurale de divers composants de machineries protéiques impliquées dans la morphogénèse de la spore chez *B. subtilis* et la division chez *E. coli*, étudiés sous un angle génétique et fonctionnel dans les laboratoires de mes collaborateurs.

Avec le laboratoire de T. Bernhardt, je me suis engagée dans une collaboration visant à comprendre les mécanismes moléculaires de l'activation des hydrolases de la paroi (les amidases AmiA, B et C) par les facteurs LytM (EnvC et NlpD) au cours de la division chez *E. coli*. J'ai résolu la structure cristallographique du domaine LytM de la protéine EnvC à 1.6 Å (Peters et al., 2013). L'analyse de cette

structure, combinée à une étude biochimique, montre un repliement identique aux endopeptidases LytM et la présence d'une cavité enzymatique dégénérée qui ne possède plus d'activité hydrolytique mais renferme le site d'interaction avec les amidases. Nous avons récemment obtenu des cristaux du complexe AmiB-EnvC et collecté des données de diffraction des rayons X à 2.9 Å. La résolution de la structure de ce complexe est en cours.

Un deuxième projet collaboratif est né du projet réalisé dans le laboratoire de D. Rudner à Boston sur le complexe SpoIIIA-SpoIIQ impliqué dans la morphogénèse de la spore chez *B. subtilis*. A mon retour en France, j'ai poursuivi cette étude d'un point de vue structural (encadrement d'une partie du post-doctorat de X. Henry) et montré que l'un des composants du complexe (SpoIIAG) forme de larges anneaux oligomériques (~ 21 nm de diamètre externe) dont nous avons résolu la structure à 35 Å par cryo-microscopie électronique (Rodrigues et al., 2016a). La présence d'un pore interne de 6 nm constitue la première donnée structurale directe qui renforce l'idée que le complexe SpoIIIA-SpoIIQ formerait un canal entre la cellule mère et la préspore pour la sécrétion ou le passage d'une molécule nécessaire au développement de la préspore. Des expériences sont en cours pour améliorer la résolution de cette structure et poursuivre l'étude structurale du complexe SpoIIIA-SpoIIQ.

Ces collaborations sont menées de front avec mes projets sur la morphogénèse et la division du pneumocoque qui reste toutefois ma thématique de recherche principale.

Un premier projet sur le pneumocoque porte sur la synthèse du précurseur du PG, un dissaccharide-pentapeptide lipidique appelé le Lipide II dont la synthèse a lieu dans le cytoplasme, puis au niveau de la face cytoplasmique de la membrane plasmique. Chez les bactéries à Gram positif, la présence d'une isoglutamine (iGln) en troisième position des chaînes peptidiques du PG est nécessaire à leur transpeptidation par les PBP. Cette iGln résulte de l'amidation d'un isoglutamate, une réaction catalysée par un complexe de deux protéines, l'amidotransferase GatD et la ligase MurT. J'ai été associée à l'étude de MurT-GatD réalisée par André Zapun dans le laboratoire et j'ai résolu la structure cristallographique de ce complexe à 2.9 Å de résolution. Cette structure est en cours de validation *in vitro* et *in vivo* par la caractérisation biochimique et cellulaire de protéines ou souches mutantes. Cette structure permettra sur le long terme de guider le développement de molécules antibactériennes, inhibitrices du complexe MurT-GatD.

Une fois synthétisé, le précurseur Lipide II est transloqué vers la face externe de la membrane cytoplasmique, puis polymérisé et incorporé au PG préexistant par les PBP et la famille des protéines FtsW/RodA (**SEDS** ou **Shape, Elongation, Division and Sporulation**) (Egan and Vollmer, 2013; Macheboeuf et al., 2006; Meeske et al., 2016). Pour préserver la morphologie et l'intégrité de la cellule, les PBP et les SEDS sont assistées par un grand nombre d'autres protéines dont les fonctions incluent principalement la dégradation partielle du PG (les hydrolases de la paroi), l'échafaudage des machineries morphogénétiques (ex: l'homologue de la tubuline FtsZ), et la régulation de l'assemblage et de l'activité

de ces machineries dans le temps et dans l'espace (ex: la Ser/Thr kinase StkP). Chez le pneumocoque, il semble que ces machineries forment plusieurs sous-complexes qui interagissent de façon transitoire au cours du cycle cellulaire.

Une protéine clé au sein des machineries morphogénétiques est la Ser/Thr kinase StkP, dont la délétion ou l'inactivation entraîne, selon les mutations introduites, une inhibition de l'élongation ou de la division du pneumocoque (Fleurie et al., 2012). Dans le cadre d'une collaboration avec le groupe de Christophe Grangeasse au laboratoire MMSB (Molecular Microbiology and Structural Biochemistry) à Lyon, j'ai étudié un des aspects du rôle régulateur de StkP dans la division de *S. pneumoniae*. Nous avons montré que StkP interagit physiquement avec la transpeptidase de la paroi PBP2x et caractérisé le complexe StkP-PBP2x de façon biochimique (Morlot et al., 2013). Il s'agit de la première mise en évidence d'une interaction entre une Ser/Thr kinase et une PBP. Nous avons par ailleurs montré que cette interaction est nécessaire à la localisation de PBP2x au site de division.

Un volet particulièrement obscur dans la compréhension du fonctionnement des machineries morphogénétiques est le rôle des hydrolases de la paroi (**CWHs** ou "**Cell Wall Hydrolases**"). Chez les organismes modèles *E. coli* et *B. subtilis*, les CWHs sont très nombreuses et possèdent des fonctions redondantes, ce qui rend leur étude fonctionnelle très difficile (Heijenoort, 2011; Vollmer et al., 2008). Chez le pneumocoque en revanche, il en existe un nombre limité et il semble qu'elles ne possèdent pas de fonctions redondantes puisque leur délétion individuelle entraîne des anomalies de forme et de division. Ces anomalies traduisent des défauts dans l'assemblage et/ou l'activité de la machinerie de division et de synthèse de la paroi (Schuster 1993 ; NgWinkler 2004 ; Pagliero, 2008 ; BarendtWinkler, 2011) mais dans la majorité des cas, on ne comprend pas pourquoi ces CWHs sont nécessaires au bon déroulement de ces processus. J'ai donc abordé cette question à travers l'étude de l'hydrolase Pmp23 (thèse de Maxime Jacq et stage de M2 de Christopher Arthaud). Nos données indiquent que Pmp23 possède une activité de lysozyme bactérien nécessaire à la morphogénèse et la division du pneumocoque. Nous avons par ailleurs montré que l'inactivation de Pmp23 entraîne une augmentation du taux de réticulation de la paroi du pneumocoque, une instabilité de l'anneau Z dans le cytoplasme et une délocalisation partielle de MapZ, une protéine récemment identifiée comme étant impliquée dans le positionnement de l'anneau Z (Fleurie et al., 2014a). Nous avons également mis en évidence une interaction physique entre Pmp23 et la transpeptidase PBP2x. L'ensemble de nos données suggèrent que Pmp23 aurait une fonction de "contrôle qualité" qui corrigerait les erreurs introduites par les synthèses de la paroi, erreurs qui peuvent mener à une délocalisation de la machinerie de division et entraîner des défauts de forme et de division. Ces travaux ont fait l'objet d'un manuscrit actuellement en révision dans le journal mBio (Jacq et al.).

Pour comprendre comment fonctionnent les machineries morphogénétiques, il faut les imager dans la cellule. Dans les deux études décrites ci-dessus, la méthode utilisée pour imager les protéines *in vivo* a été la microscopie optique en fluorescence. Toutefois, dû à la diffraction de la lumière, la

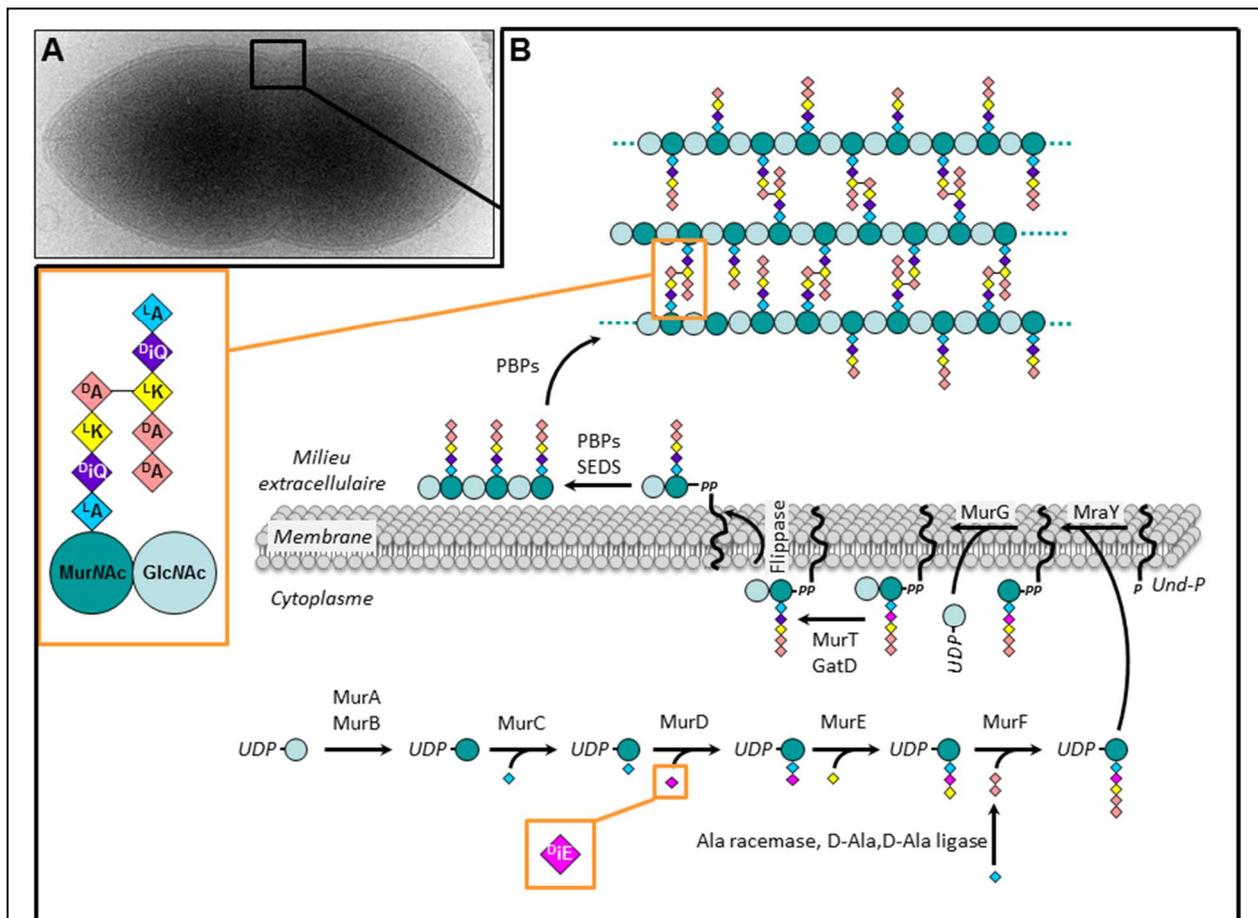
résolution de la microscopie en fluorescence conventionnelle est limitée à ~250 nm, ce qui approxime un quart de la taille moyenne d'une cellule bactérienne et restreint l'observation de la structure et de la dynamique des machineries protéiques. Mon recrutement au CNRS a coïncidé avec l'émergence des techniques de microscopie super-résolue qui permettent de déterminer *in vivo* la structure de gros assemblages moléculaires à l'échelle nanométrique (Cattoni et al., 2012; Coltharp and Xiao, 2012). Pour dépasser les limites de l'imagerie cellulaire chez le pneumocoque et localiser *in vivo* les protéines de la division à haute résolution (~20 nm), j'ai donc choisi de développer l'usage de l'une de ces techniques, appelée **PALM** ou "**PhotoActivated Localization Microscopy**", chez cette bactérie (Sengupta et al., 2014). La première protéine étudiée a été la protéine majeure de la division, FtsZ, qui forme une structure annulaire (l'anneau Z) servant de plateforme d'assemblage pour les machineries morphogénétiques (Erickson et al., 2010). Ce projet a bénéficié d'un financement (Labex GRAL, Grenoble Alliance for Integrated Structural Biology) pour un étudiant en thèse (M. Jacq) que j'ai co-encadré avec ma collègue Anne Marie Di Guilmi, en collaboration avec des biophysiciens experts en protéines fluorescentes (Virgile Adam et Dominique Bourgeois de l'équipe Pixel de l'IBS). La réussite de ce projet a nécessité l'ingénierie de la protéine fluorescente Dendra2 et a mené à la détermination de la nanostructure de l'anneau Z. Cette étude PALM a révélé une architecture granulaire hétérogène de l'anneau Z, ainsi qu'une nouvelle corrélation entre ses dimensions et l'avancement du cycle cellulaire. Par ailleurs, nos données ont révélé une nouvelle sous-structure qui pourrait s'assembler juste avant la phase de constriction de l'anneau (Jacq et al., 2015). La mise au point de l'usage du PALM 1-couleur chez *S. pneumoniae* a constitué la première étape d'un projet de plus grande ampleur visant à élucider l'architecture cellulaire des machineries morphogénétiques *in vivo* à haute résolution. Le prochain objectif est de mettre en place la technique de PALM 2-couleurs afin de co-localiser des paires de protéines morphogénétiques et de comprendre comment elles s'organisent sur l'anneau Z. Cette mise au point est l'objectif principal de la thèse de C. Arthaud que je co-encadre depuis Octobre 2015 avec Thierry Vernet. Ces études de co-localisation en microscopie super-résolue 2-couleurs sont par ailleurs au cœur du projet DIVinHD dont je suis la coordinatrice et qui a obtenu un financement par l'ANR pour la période 2016-2021. A long terme, ces études en PALM intégreront les projets que j'ai précédemment décrits sur la morphogénèse et la division du pneumocoque, et possiblement le projet réalisé chez *B. subtilis*.

## II - Développement thématique des activités de recherche

### A. Morphogénèse et division chez *S. pneumoniae*

#### 1. Introduction

Les processus de morphogénèse et de division sont intimement liés à la synthèse de la paroi bactérienne, responsable de la résistance mécanique et de la forme des bactéries. L'entité chimique commune et essentielle à la paroi de toutes les bactéries est le **peptidoglycane (PG)**, un polymère composé de chaînes polysaccharidiques (alternance d'acide *N*-acétylmuramique (MurNAc) et de *N*-acétylglucosamine (GlcNAc)) réticulées par des chaînes peptidiques (composées de D-Ala, D-iGln, L-Lys, D-Ala et D-Ala chez *S. pneumoniae*, Fig. 1) (Vollmer et al., 2008a).



**Figure 1. Biosynthèse du PG chez *S. pneumoniae*.** A. Image en cryo-microscopie électronique d'une cellule de *S. pneumoniae* en cours de division. B. Représentation schématique des étapes cytoplasmiques, membranaires et extracellulaires de la biosynthèse du PG. Dans les étapes cytoplasmiques, MurA et MurB synthétisent l'UDP-MurNAc à partir d'UDP-GlcNAc. Les ligases MurC, MurD, MurE et MurF ajoutent ensuite les acides aminés L-Alanine (L<sup>A</sup>), D-isoGlutamate, (D<sup>i</sup>E), L-Lysine (L<sup>K</sup>) et D-Alanine (D<sup>A</sup>) qui composent la chaîne peptidique de l'UDP-MurNAc pentapeptide. Dans les étapes membranaires, MurF phosphoryle ce dernier et le transfère sur un groupement undécaprenyl-phosphate pour former le Lipide I. MurG ajoute alors le GlcNAc pour former le Lipide II. Après amidation du D-isoglutamate en iGlutamine (D<sup>i</sup>Q) par le complexe MurT-GatD, le Lipide II est transloqué vers la face externe de la membrane cytoplasmique par les protéines SEDS ou par MurJ. Les chaînes de sucre sont alors polymérisées par les protéines SEDS et par les domaines glycosyltransférase des PBPs. Ces chaînes sont enfin insérées dans le réseau de PG existant par pontage covalent entre la L-Lys et l'avant-dernier D-Ala de deux chaînes peptidiques voisines, une réaction catalysée par les domaines transpeptidase des PBPs.

La perturbation de la biosynthèse du PG entraîne des dommages dont la gamme s'étend de simples défauts morphologiques à des brèches catastrophiques dans le réseau de PG, menant à la lyse cellulaire. De fait, les antibiotiques les plus couramment utilisés sont les  **$\beta$ -lactamines**, telles que les pénicillines, qui **inhibent la biosynthèse du PG en ciblant les synthases du PG**, les "**Penicillin-Binding Proteins**" ou **PBPs**. De nombreuses espèces bactériennes sont maintenant résistantes à ces antibiotiques, il y a donc un besoin urgent de développer de nouvelles molécules antibactériennes. La découverte de solutions thérapeutiques innovantes passe par l'étude de processus essentiels à la vie des bactéries telles que la synthèse du PG et la division cellulaire, qui divergent selon la composition (Gram+ caractérisée par une membrane interne surmontée d'une couche épaisse de PG, ou Gram- caractérisée par une membrane interne surmontée d'une fine couche de PG et d'une membrane externe) de l'enveloppe de la bactérie et la forme du microorganisme. En dépit du grand nombre de coques et ovocoques à Gram+ pathogènes pour l'homme (streptocoques, staphylocoques, entérocoques), la majorité des études portant sur les processus de morphogénèse et de division cellulaire a longtemps été menée sur des bacilles à Gram- ou Gram+ (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*).

**a. *S. pneumoniae*, un pathogène humain devenu modèle d'étude de la morphogénèse bactérienne**

*Streptococcus pneumoniae*, couramment appelé le **pneumocoque**, est à la fois une bactérie de **forme ovoïde** (Fig. 1A) et un **pathogène humain majeur**. Présente de manière asymptomatique au niveau du nasopharynx chez l'Homme, elle peut toutefois causer des pathologies sévères lorsqu'elle envahit des zones normalement stériles. D'après une estimation de l'organisation mondiale de la santé (OMS), 1.6 million de personnes meurent chaque année dans le monde de maladies liées au pneumocoque. Les populations à risque sont principalement les personnes ayant un système immunitaire faible (enfants de moins de 5 ans, personnes âgées ou immunodéprimées). Le pneumocoque est en particulier l'agent principal de la pneumonie, qui est la première cause de décès des enfants de moins de 5 ans (30% des décès dans cette tranche d'âge).

La transition de l'état commensal à l'état virulent n'est pas encore totalement élucidée mais il semblerait que suite à une diminution des défenses de l'hôte (système immunitaire et défenses mécaniques des voies respiratoires), le pneumocoque puisse coloniser des organes qui sont normalement stériles (sphère ORL, poumons, sang ou cerveau), causant différentes infections et provoquant des maladies plus ou moins graves en fonction du site d'infection. Les infections de moindre gravité et de plus forte incidence incluent des otites moyennes, des sinusites ou encore des bronchites. Les autres infections correspondent aux pneumonies, méningites et septicémies. Les pneumonies dues au pneumocoque représentent 30 à 50% des pneumonies bactériennes, le reste des pneumonies étant essentiellement dues à la bactérie *Haemophilus influenzae* ou au virus respiratoire syncytial. Le passage du pneumocoque dans la voie sanguine est encore mal compris mais il semble qu'il s'effectuerait à partir

d'un organe infecté (poumons, sphère ORL). Une fois dans le sang, le pneumocoque peut atteindre différents organes, et notamment le cerveau, provoquant une méningite (inflammation des méninges et du liquide céphalorachidien). La dissémination du pneumocoque par voie sanguine peut enfin atteindre l'ensemble de l'organisme, provoquant une septicémie. En France, dans les années 2000, les maladies dues au pneumocoque étaient estimées à 132 000 pneumonies, 5 000 septicémies et 400-500 méningites par an (Black et al., 2004; Gaillat, 1998).

Le pouvoir pathogène du pneumocoque est lié à sa capacité à déclencher une réponse inflammatoire au niveau des tissus colonisés et au relargage de la pneumolysine, une toxine qui forme des pores dans les cellules de l'hôte et mène à leur lyse, et qui interfère également avec la fonction des cellules et molécules de l'immunité innée (Baba et al., 2001; Hirst et al., 2004).

Les infections à pneumocoques peuvent être prévenues par vaccination des personnes à risque. Les vaccins, qui sont élaborés à partir de polysaccharides capsulaires, ciblent 7 ou 23 types capsulaires (Prevenar PnC7 (Pfizer) et Pneumovax23 (Merck)) et la grande diversité des types capsulaires du pneumocoque rend la couverture vaccinale partielle. En cas d'infection, la famille d'antibiotiques la plus couramment utilisée est celle des  $\beta$ -lactamines, qui inhibent les PBPs. Les premières souches de pneumocoque résistantes aux  $\beta$ -lactamines sont apparues dans les années 70 et depuis, sa capacité à échanger du matériel génétique avec des souches de la même espèce ou d'espèces voisines (*S. mitis*, *S. pyogenes*, ...) a causé l'expansion croissante et inquiétante de la **résistance de *S. pneumoniae* aux  $\beta$ -lactamines**, basée sur l'**expression de PBPs mutantes, d'affinité diminuée pour les antibiotiques**. *S. pneumoniae* a été répertoriée dans la liste des 12 espèces bactériennes les plus menaçantes en termes de résistance aux antibiotiques dans le dernier rapport de l'OMS (2017) et il est donc nécessaire de rechercher de nouvelles stratégies pour lutter contre cette bactérie, ce qui nécessite une compréhension fine de ses mécanismes fondamentaux tel le processus de division cellulaire.

La difficulté à effectuer des recherches sur *S. pneumoniae* a longtemps été due à la pauvreté des outils de biologie cellulaire utilisables chez ce micro-organisme. Au cours de ma thèse (2000-2003), j'ai contribué au développement de ces outils en mettant au point la méthode d'imagerie des cellules de pneumocoque par immunofluorescence qui a révélé des aspects nouveaux et inattendus pour la division des coques (Morlot et al., 2003, 2004; Noirclerc-Savoye et al., 2005). Plus récemment, de nouveaux outils de génétique et de microscopie en fluorescence ont été développés pour l'étude de processus cellulaires chez *S. pneumoniae* (Eberhardt et al., 2009; Sung et al., 2001). Depuis mon recrutement au CNRS en 2010, j'ai acquis une bonne expertise dans l'utilisation de ces nouveaux outils et j'ai également contribué à leur développement pour étudier la morphogénèse et la division du pneumocoque, notamment à travers le développement de l'usage d'une technique de microscopie super-résolue chez cette bactérie (Jacq et al., 2015; Morlot et al., 2013). *S. pneumoniae* est aujourd'hui devenu le modèle majeur pour l'étude de la morphogénèse et de la division chez les ovocoques, qui sont largement représentés parmi les espèces pathogènes (streptocoques et entérocoques).

## **b. Synthèse du peptidoglycane : rôle des protéines Mur, PBPs et SEDS**

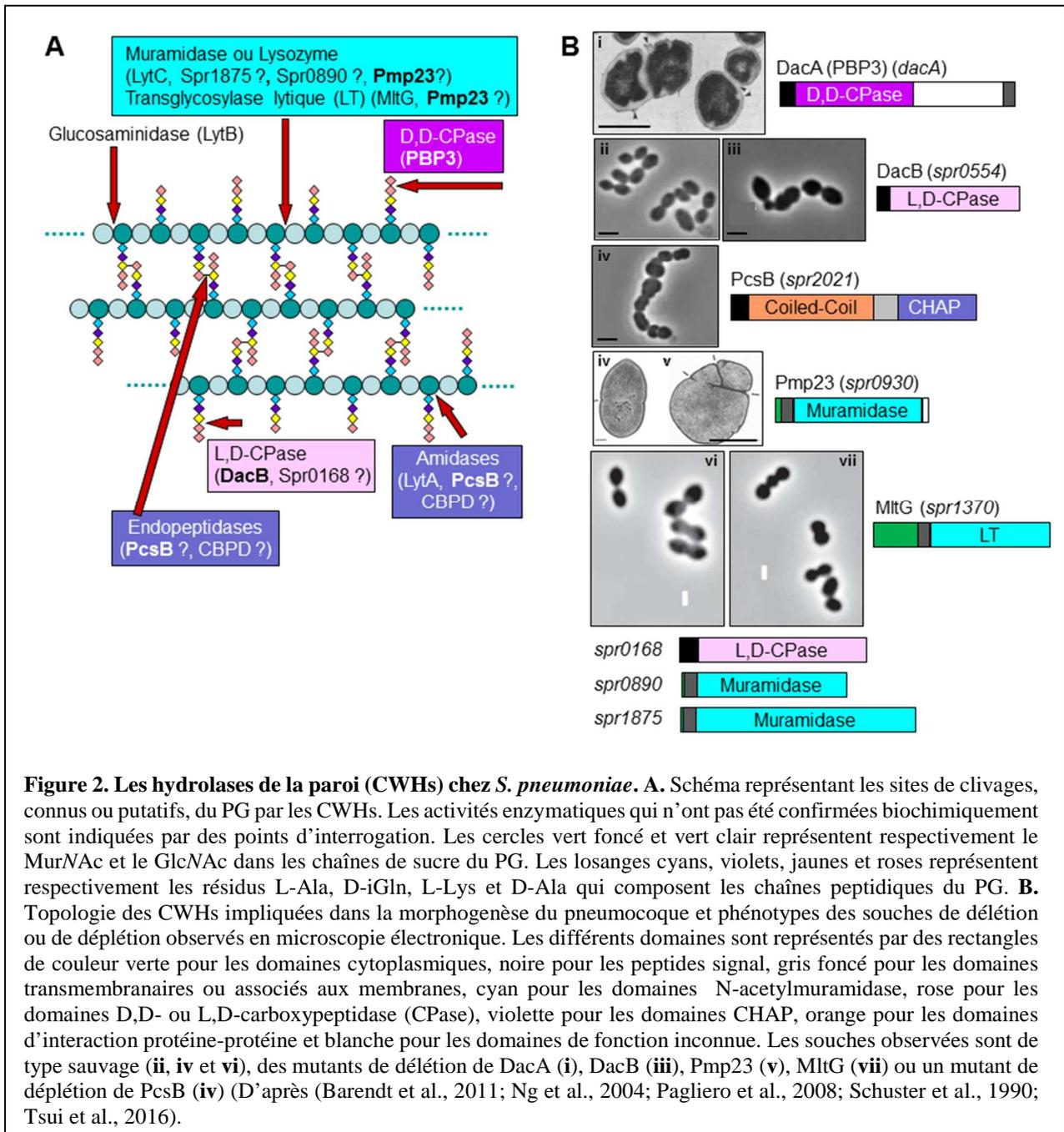
L'assemblage du PG débute dans le cytoplasme avec la synthèse de son précurseur, le **Lipide II**, un disaccharide MurNAc-GlcNAc associé à une chaîne pentapeptidique (L-Ala, D-isoGln, L-Lys, D-Ala, D-Ala) et lié à la membrane par un groupement undécaprényl phosphate (Fig. 1B). Cette synthèse résulte d'une cascade de réactions enzymatiques réalisées par la famille des protéines Mur qui assemblent étape par étape les différents blocs saccharidiques, peptidiques et lipidiques du Lipide II (Fig. 1B) (Barreteau et al., 2008; Bouhss et al., 2008; Kouidmi et al., 2014; Matěj et al., 2010).

J'ai étudié la structure tridimensionnelle de l'une des protéines Mur (**MurT**) en complexe avec son partenaire **GatD** et ces travaux sont décrits dans le paragraphe II.A.2.a.

Suite à sa synthèse cytoplasmique, le Lipide II est transloqué vers la face externe de la membrane cytoplasmique par la protéine **MurJ** et/ou par les protéines **SEDS** (Shape, Elongation, Division, Sporulation) FtsW et RodA (Fig. 1B), respectivement essentielles à la division et à l'élongation du pneumocoque (Meeske et al., 2016; Mohammadi et al., 2011; Noirclerc-Savoie et al., 2013; Ruiz, 2016; Zapun et al., 2012).

Les dernières étapes de l'assemblage du PG sont extracellulaires et nécessitent la combinaison d'activités **transglycosylase (GT)** pour la polymérisation des chaînes de sucre et **transpeptidase (TP)** pour la réticulation des chaînes peptidiques. Ces réactions sont assurées par les PBPs et les protéines SEDS (FtsW et RodA) (Meeske et al., 2016; Sauvage et al., 2008). Les PBPs sont ancrées ou accolées à la membrane cytoplasmique via un segment transmembranaire ou une hélice amphiphile. Leurs domaines fonctionnels sont localisés à la surface de la cellule et définissent une classification en trois groupes (Ghuysen, 1991). La catégorie des PBPs de haute masse moléculaire est divisée en deux classes: la **classe A** est constituée d'**enzymes bi-fonctionnelles possédant les activités GT et TP (PBP1a, PBP2a et PBP1b** chez *S. pneumoniae*) et fonctionne de façon autonome, alors que la **classe B** est constituée de **PBPs mono-fonctionnelles portant l'activité TP**, ces dernières **fonctionnant en binôme avec une protéine SEDS qui assure l'activité GT** (paires **PBP2x / FtsW** et **PBP2b / RodA** chez *S. pneumoniae*) (Meeske et al., 2016; Sauvage et al., 2008). Enfin, la catégorie des PBPs de faible masse moléculaire est constituée d'enzymes ayant une activité endopeptidase ou **D,D-Carboxypeptidase (D,D-CPase) (PBP3 ou DacA** chez *S. pneumoniae*). Les activités TP et D,D-CPase sont inhibées par les antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines, telles que les pénicillines. Les activités enzymatiques des PBPs ont été beaucoup étudiées au cours des 50 dernières années. En revanche, l'activité GT des protéines SEDS, qui comportent dix segments transmembranaires, n'a été découverte que récemment et reste donc à caractériser d'un point de vue biochimique et structural (Meeske et al., 2016; Sauvage et al., 2008).

Les études que j'ai réalisées sur les PBPs, qui incluent mes travaux de thèse et une partie des travaux de M. Jacq dont j'ai co-supervisé la thèse, sont décrites dans les paragraphes II.A.2.b et II.A.2.c.



### c. Hydrolyse du peptidoglycane : rôle des hydrolases de la paroi

Outre les PBPs et les SEDS qui assurent la synthèse du PG, le cycle de croissance et de division bactérienne requiert une famille d'enzymes dont l'étude a été relativement négligée jusqu'à récemment: les hydrolases de la paroi (CWHs ou "Cell Wall Hydrolases"). Ces dernières catalysent diverses réactions d'hydrolyse du PG qui incluent des activités peptidase, amidopeptidase et glycosidase (Fig. 2A) (Heijenoort, 2011; Vollmer et al., 2008b). Chez *S. pneumoniae* il existe au moins 12 CWHs (Fig. 2A); certaines sont impliquées dans l'autolyse et l'action fratricide du pneumocoque (LytA, LytB, LytC, CBPD) alors que d'autres sont impliquées dans le remodelage du PG et le maintien de la forme

bactérienne (DacA, DacB, PcsB, Pmp23, MltG, Spr1875, Spr0890 et Spr0168) (Barendt et al., 2011; Tsui et al., 2016). La fonction exacte de la plupart de ces hydrolases reste encore non élucidée.

La première CWH identifiée comme acteur de la morphogénèse du pneumocoque est **DacA** (PBP3, gène *dacA*), une D,D-CPase qui clive les deux derniers résidus (D-Ala-D-Ala) portés par les chaînes peptidiques du PG, générant des térapeptides qui ne peuvent plus être utilisés par les PBPs. Sa délétion entraîne des défauts morphologiques incluant des cellules arrondies et un mauvais positionnement des septa (Fig. 2B) (Barendt et al., 2011; Schuster et al., 1990). J'ai étudié la fonction et la structure de DacA au cours de ma thèse et ces travaux seront décrits dans le paragraphe II.A.2.e.i.

**DacB** (gène *spr0554*) est une L,D-CPase également impliquée dans la maintenance de la forme du pneumocoque. Elle ne peut cliver que les produits térapeptidiques générés par DacA et sa délétion entraîne des événements de division désordonnés qui se traduisent par des cellules arrondies, allongées ou plus petites (Fig. 2B) (Barendt et al., 2011; Schuster et al., 1990).

**PcsB** (gène *spr2021*) est une CWH essentielle dont la déplétion altère la séparation des cellules filles et entraîne des formes irrégulières et la présence de septa mal positionnés (Fig. 2B) (Barendt et al., 2011; Ng et al., 2004). Localisée au site de division, elle possède un domaine CHAP (Cysteine, Histidine-dépendent Amidohydrolases/Peptidases) qui en fait une N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase ou une endopeptidase potentielle (Fig. 2A). Son activité hydrolytique serait auto-inhibée et activée par une interaction avec les protéines de division FtsE et FtsX (Bartual et al., 2014; Sham et al., 2011).

Parmi les CWHs morphogénétiques, on compte également **Pmp23** (gène *spr0930*), dont la délétion entraîne des aberrations morphologiques incluant des angles de septation non parallèles et des cellules déformées ou allongées (Fig. 2B.v) (Barendt et al., 2011; Pagliero et al., 2008). Les travaux sur Pmp23 que j'ai encadrés au cours de la thèse de M. Jacq et du M2 de C. Arthaud sont décrits dans le paragraphe II.A.2.e.ii.

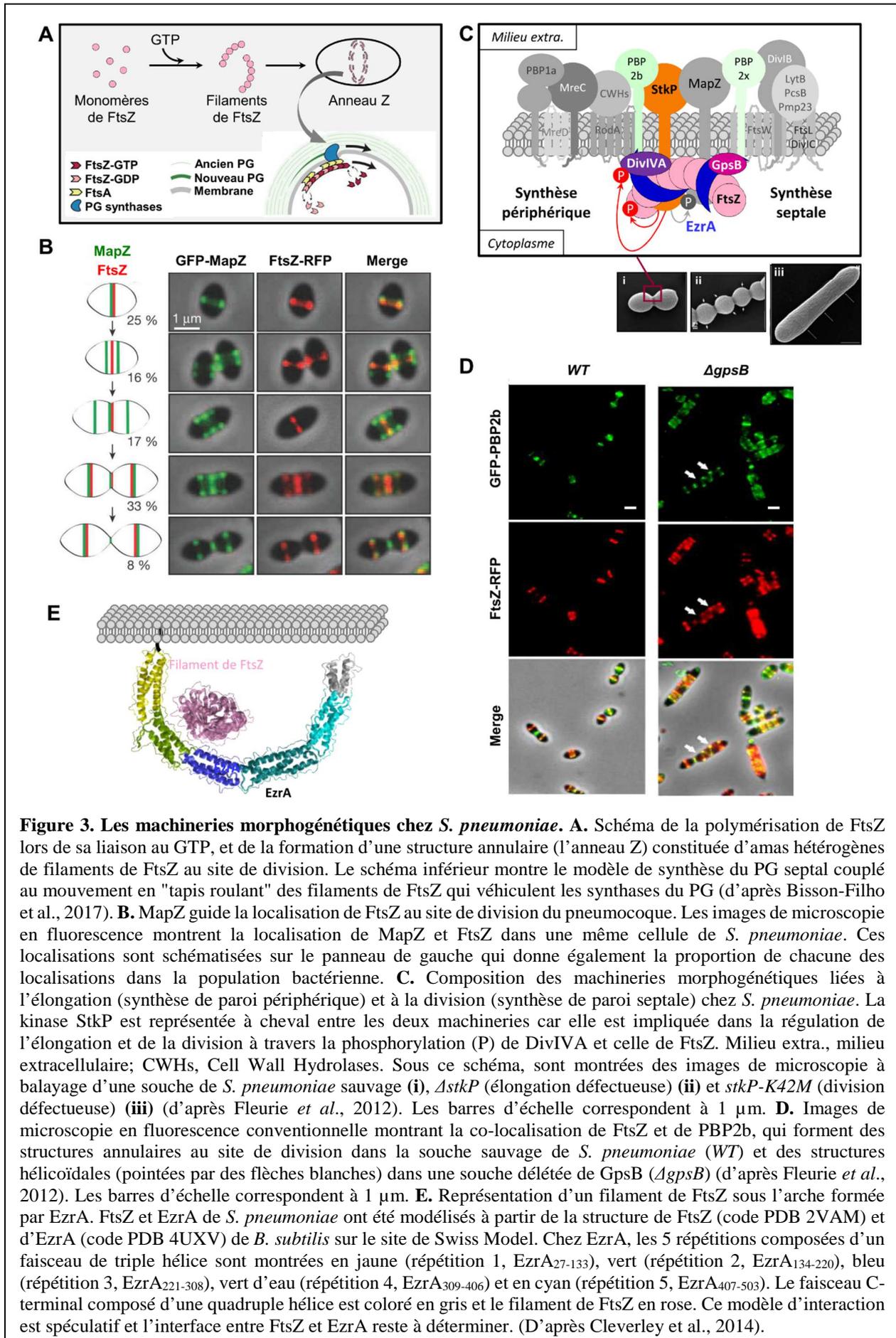
**MltG** (gène *spr1370*) est une CWH membranaire identifiée récemment. Homologue de l'endoglycosylase lytique MltG de *E. coli*, son inactivation entraîne une forme arrondie des cellules (Fig. 2B.vii) et lève le caractère essentiel des synthèses PBP2b et RodA, suggérant un modèle dans lequel MltG libérerait les brins glycanes synthétisés par PBP1a pour qu'ils puissent être incorporés au PG existant par le couple PBP2b/RodA (Tsui et al., 2016; Yunck et al., 2016).

Le génome de *S. pneumoniae* code enfin pour 3 autres CWHs potentielles de fonction inconnue: **Spr1875** et **Spr0890** seraient des N-acétylmuramidases et **Spr0168** serait une L,D-CPase. La délétion individuelle de ces CWHs n'entraîne pas de phénotype morphologique, suggérant qu'elles pourraient avoir un rôle redondant avec d'autres CWHs (Barendt et al., 2011).

L'action hydrolytique des CWHs étant potentiellement létale, leur activité doit être coordonnée à l'activité des PBPs et finement régulée dans le temps et dans l'espace. Un déséquilibre dans l'activité de ces deux familles enzymatiques peut être effectivement dramatique pour la cellule. Ainsi lorsque l'activité TP des PBPs est inhibée par les  $\beta$ -lactamines, l'activité hydrolytique anarchique des CWHs entraîne la lyse cellulaire.

#### **d. Les machineries morphogénétiques**

La synthèse et le remodelage du PG doivent non seulement être coordonnés entre eux, mais ils doivent également être couplés aux autres processus liés à la division bactérienne, telle que la synthèse et la constriction de la membrane cytoplasmique. La coordination de tous ces processus repose sur un réseau complexe d'interactions physiques et/ou fonctionnelles incluant les flippases du précurseur Lipide II du PG, des synthases du PG (PBPs et protéines SEDS), des CWHs, des protéines régulatrices (ex : StkP) et des protéines structurales (ex : FtsZ, EzrA, DivIVA, GpsB). De nombreuses données génétiques, moléculaires et cellulaires suggèrent que la plupart de ces interactions s'établissent au sein de larges complexes protéiques appelés "**machineries morphogénétiques**" échafaudées initialement par la protéine du cytosquelette FtsZ (den Blaauwen et al., 2008; Holtje, 1998; Typas et al., 2012; Zapun et al., 2012). **FtsZ** est un homologue de la tubuline eucaryote qui, lorsqu'elle se lie au GTP, polymérise pour former au centre de la bactérie une structure annulaire appelée l'anneau Z (Fig. 3A) (Erickson et al., 2010). De récentes études en microscopie super-résolue ont montré que l'anneau Z est constitué d'amas hétérogènes de filaments de FtsZ (voir section II.A.2.c) (Biteen et al., 2012; Fu et al., 2010; Holden et al., 2014; Meier and Goley, 2014). L'hydrolyse du GTP entraîne la courbure des filaments de FtsZ avant de provoquer leur dépolymérisation (Erickson et al., 2010; Li et al., 2013). Les cycles successifs de polymérisation et dépolymérisation de FtsZ vont ainsi permettre un mouvement en "tapis roulant" des filaments de FtsZ et une constriction progressive de l'anneau Z au cours du cycle cellulaire, ce qui va participer à la force motrice nécessaire à la constriction membranaire (Erickson et al., 2010). FtsZ est la première protéine recrutée au site de division et diverses études (réalisées chez les bacilles et chez les coques) ont montré qu'elle recrute de façon directe de nombreuses protéines morphogénétiques localisées dans le cytoplasme (ex : FtsA, EzrA), et de façon indirecte un certain nombre de protéines localisée à la surface de la cellule, ce qui inclue les PBPs à travers une interaction avec EzrA et GpsB (Claessen et al., 2008; Egan and Vollmer, 2013; Fleurie et al., 2014b; Maggi et al., 2008). FtsZ échafaude donc la machinerie de synthèse du PG septal et une étude récente combinant diverses techniques de microscopie de fluorescence a montré que le mouvement en "tapis roulant" des filaments de FtsZ permet de véhiculer cette machinerie autour du site de division, dans les deux sens de rotation (Bisson-Filho et al., 2017; Yang et al., 2017).



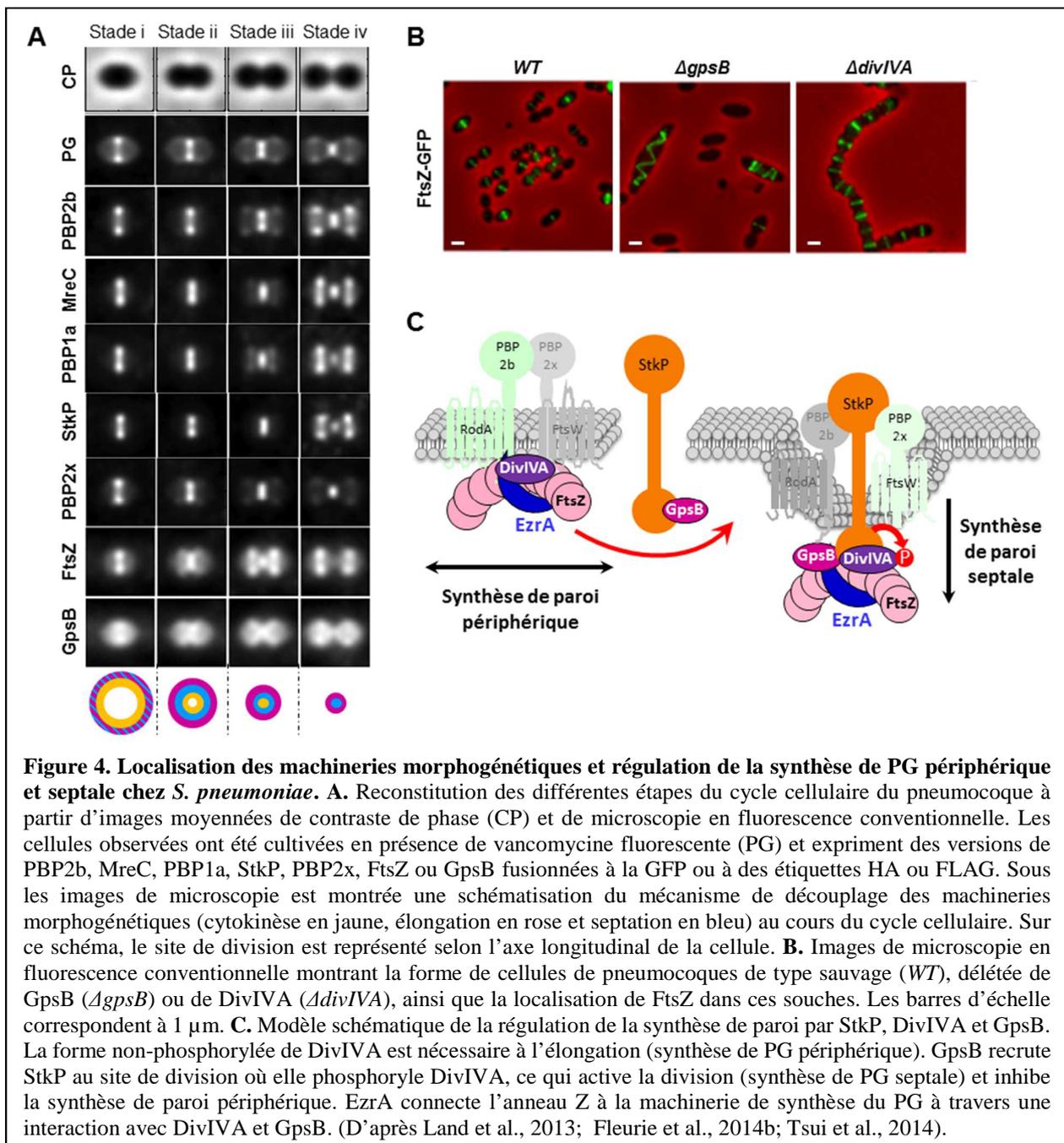
FtsZ est elle-même positionnée au site de division par la protéine **MapZ** (Mid-cell Anchored protein Z), également nommée **LocZ** (Fleurie et al., 2014a; Grangeasse and Lesterlin, 2015; Holečková et al., 2015). MapZ possède un domaine cytoplasmique dont la région N-terminale (les 41 premiers acides aminés) interagit avec FtsZ. Ce domaine est par ailleurs phosphorylé par la Ser/Thr kinase StkP qui est un régulateur majeur de la division chez *S. pneumoniae* (Fleurie et al., 2014a). En aval de ce domaine cytoplasmique, MapZ possède un segment transmembranaire ainsi qu'un domaine extracellulaire qui se lie au PG et guide sa localisation septale (Fleurie et al., 2014a; Manuse et al., 2016a). Au début du cycle cellulaire, l'apparition d'un anneau de MapZ au site de division précède l'apparition de l'anneau Z. L'anneau unique de MapZ se dédouble ensuite en deux anneaux qui resteront positionnés aux futurs sites de division des cellules filles et s'éloigneront progressivement au fur et à mesure que la paroi est synthétisée en périphérie du septum parental (élongation) (Fig. 3B). Après dédoublement de l'anneau initial de MapZ, un troisième anneau apparaît au site de division de la cellule mère. Comme pour les enzymes de synthèse de la paroi, sa constriction est retardée par rapport à celle de l'anneau Z. En absence de MapZ ou lorsque MapZ est délocalisée, l'anneau Z présente des défauts de positionnement et de structure, ce qui engendre des défauts de division et de forme cellulaire (Fleurie et al., 2014a). L'ensemble de ces observations suggère un modèle dans lequel le domaine cytoplasmique de MapZ recruterait FtsZ au site de division du pneumocoque, MapZ se dédoublerait ensuite en deux anneaux qui marqueraient la position des futurs sites de division des cellules filles grâce à l'interaction du domaine extracellulaire de MapZ avec la paroi, supposée de composition particulière sur ces sites. La fonction du troisième anneau MapZ reste inconnue mais elle pourrait être nécessaire à la constriction de FtsZ (Fleurie et al., 2014a).

La complexité de la forme bactérienne requiert différents modes d'insertion du PG. L'un permet l'élongation de la bactérie et est catalysé par une machinerie morphogénétique appelée l'"**élongasome**", l'autre permet à la bactérie de se diviser et est catalysé par une machinerie appelée le "**divisome**" (Blaauwen et al., 2008; Szwedziak and Löwe, 2013). Chez *S. pneumoniae*, différentes observations supportent l'existence d'un mode de synthèse de la paroi dédié à l'élongation (synthèse de PG périphérique) et d'un mode dédié à la division (synthèse de PG septale) (Fig. 3C). Notamment, l'altération de la fonction de certaines PBPs ou de la Ser/Thr kinase StkP (par génétique ou utilisation d'antibiotiques spécifiques) résulte en des morphologies sphériques ou allongées, traduisant un arrêt de la synthèse de PG liée à l'élongation ou à la division (Fig. 3C) (Berg et al., 2013; Fleurie et al., 2012; Philippe et al., 2015). Ces observations soutiennent l'idée qu'il existe **deux types de synthèse du PG chez *S. pneumoniae***, la **synthèse septale** et la **synthèse périphérique**, qui sont catalysées par un divisome et un élongasome qui pourraient partager des composants communs mais qui contiennent également des protéines spécifiques puisque leur fonctionnement peut être découplé.

L'interdépendance spatio-temporelle des machineries morphogénétiques chez le pneumocoque reste une question non résolue. En résumé, l'élongasome et le divisome semblent former un complexe unique au début du cycle cellulaire, puis former deux complexes distincts, sans que l'on sache exactement quand et comment cette scission apparaît. Je me suis intéressée à cette question au cours de ma thèse en étudiant la localisation de FtsZ et des PBPs au cours du cycle cellulaire par microscopie en fluorescence conventionnelle (résolution limitée à ~250 nm) (travaux détaillés dans le paragraphe II.A.2.b). Ces travaux ont notamment montré que PBP2b et PBP1a (impliquées dans l'élongation), ainsi que PBP2x (impliquée dans la division), co-localisent avec FtsZ au centre de la cellule en phase pré-divisionnelle (Figs. 4A et 6A) (Morlot et al., 2003). Plus récemment, des études réalisées dans le laboratoire de C. Grangeasse ont confirmé cette observation et montré que cette co-localisation persiste dans de nombreux mutants morphogénétiques (variants *stkP*, *ΔgpsB*, *ΔdivIVA*, ...), y compris lorsque l'anneau Z adopte des structures aberrantes telles que des hélices (Fig. 3D) (Fleurie et al., 2014b). L'ensemble de ces données suggère que **chez *S. pneumoniae*, en début de cycle cellulaire, les machineries de synthèse septale et périphérique forment un complexe protéique unique recruté et échafaudé par FtsZ au site de division** (Fig. 3C). La connexion entre l'anneau Z et les PBPs est assurée par une interaction entre l'anneau Z et **EzrA**, une protéine possédant un domaine soluble localisé dans le cytoplasme et ancrée à la membrane par un segment transmembranaire N-terminal (Fig. 3E) (Haeusser et al., 2004; Singh et al., 2007). EzrA interagit directement avec les PBPs ou indirectement via **GpsB**, qui interagit elle-même avec les PBPs (Claessen et al., 2008; Fleurie et al., 2014b). Sa forme en fer à cheval et sa taille suggère que plusieurs protéines de la division (FtsZ, GpsB, DivIVA, ...) pourraient être accommodées sous l'arche formée par EzrA, dont le diamètre mesure environ 120 Å (Fig. 3E) (Cleverley et al., 2014).

La dépendance spatiale entre FtsZ et les machineries morphogénétiques ne persiste pas tout au long du cycle cellulaire puisque mes travaux de thèse ont montré que même à basse résolution, il est possible de visualiser un retard de localisation des PBPs par rapport à l'anneau Z (Fig. 6A) (Morlot et al., 2003). Récemment, des expériences de 3D-SIM (3D-Structured Illumination Microscopy, résolution d'~110 nm) combinées à une méthode de moyennage d'images en microscopie en fluorescence conventionnelle ont également révélé que PBP2b présente un retard de localisation par rapport à PBP2x (Fig. 4A) (Land et al., 2013; Tsui et al., 2014). Ces études ont également montré que PBP1a, MreC et StkP adoptent le même profil de localisation que PBP2b. En ce qui concerne PBP1a, ces travaux supportent des données plus anciennes montrant que la délétion du gène *pbp1a* génère des cellules de diamètre et de longueur réduits, suggérant un rôle dans l'élongation du pneumocoque (Land and Winkler, 2011). Certaines protéines semblent donc appartenir spécifiquement à la **machinerie d'élongation (PBP2b, PBP1a, RodA et MreC)** ou de **division (PBP2x, FtsW)**. En revanche, d'autres protéines pourraient participer aux deux machineries. C'est par exemple le cas de **StkP**, une protéine bitopique possédant un domaine **Ser/Thr kinase** intracellulaire, un segment transmembranaire et un

domaine extracellulaire composé de quatre domaines **PASTA (PBPs And Ser/Thr kinase Associated domain)** qui se lie au PG (Manuse et al., 2016b). Des études réalisées dans le laboratoire de C. Grangeasse ont montré que la délétion de StkP ou de son domaine kinase inhibe l'élongation du pneumocoque alors que la délétion de son domaine de liaison au PG, ou l'inactivation de son activité kinase inhibe la division (Fig. 3C) (Fleurie et al., 2012). StkP est donc impliquée dans les deux modes de synthèse du PG. En accord avec cette idée, StkP est localisée au site de division et activée par une protéine nécessaire à la division du pneumocoque, GpsB, mais phosphoryle une protéine nécessaire à l'élongation, DivIVA (Fig. 4B-C) (Fleurie et al., 2012, 2014b). Par ailleurs, j'ai montré une interaction directe entre StkP et PBP2x (impliquée dans la division), ainsi qu'un rôle de StkP dans la localisation de PBP2x (Morlot et al., 2013). Ces travaux sont décrits dans le paragraphe II.A.2.d.



L'ensemble de ces données suggèrent un modèle dans lequel au début du cycle cellulaire du pneumocoque, l'anneau Z sert de plateforme d'assemblage pour les machineries d'élongation et de septation qui ne formeraient alors qu'un seul complexe protéique au site de division. FtsZ interagit avec la protéine structurale EzrA qui interagit elle-même avec les PBPs et DivIVA, dont la forme non phosphorylée stimulerait l'activité de la machinerie d'élongation. L'arrivée de GpsB au site de division recruterait ensuite StkP, qui recruterait elle-même PBP2x. L'activation de l'activité kinase de StkP par GpsB entraînerait la phosphorylation de DivIVA, inhibant l'activité de la machinerie d'élongation et stimulant celle de la machinerie de septation. C'est probablement à cette étape-là que FtsZ, les machineries d'élongation et de septation se découplent spatialement, à travers un mécanisme qui reste à élucider.

## 2. Travaux réalisés

### a. Synthèse cytoplasmique du précurseur du PG: structure du complexe MurT-GatD

Contexte temporel et financier: travaux présents (IBS, Grenoble). Financement IMMI-INSERM/Astra Zeneca PATI (2014-2018, coordonné par. A. Zapun, IBS, Grenoble).

Collaboration: au sein du groupe Pneumocoque (IBS) avec A. Zapun, porteur du projet.

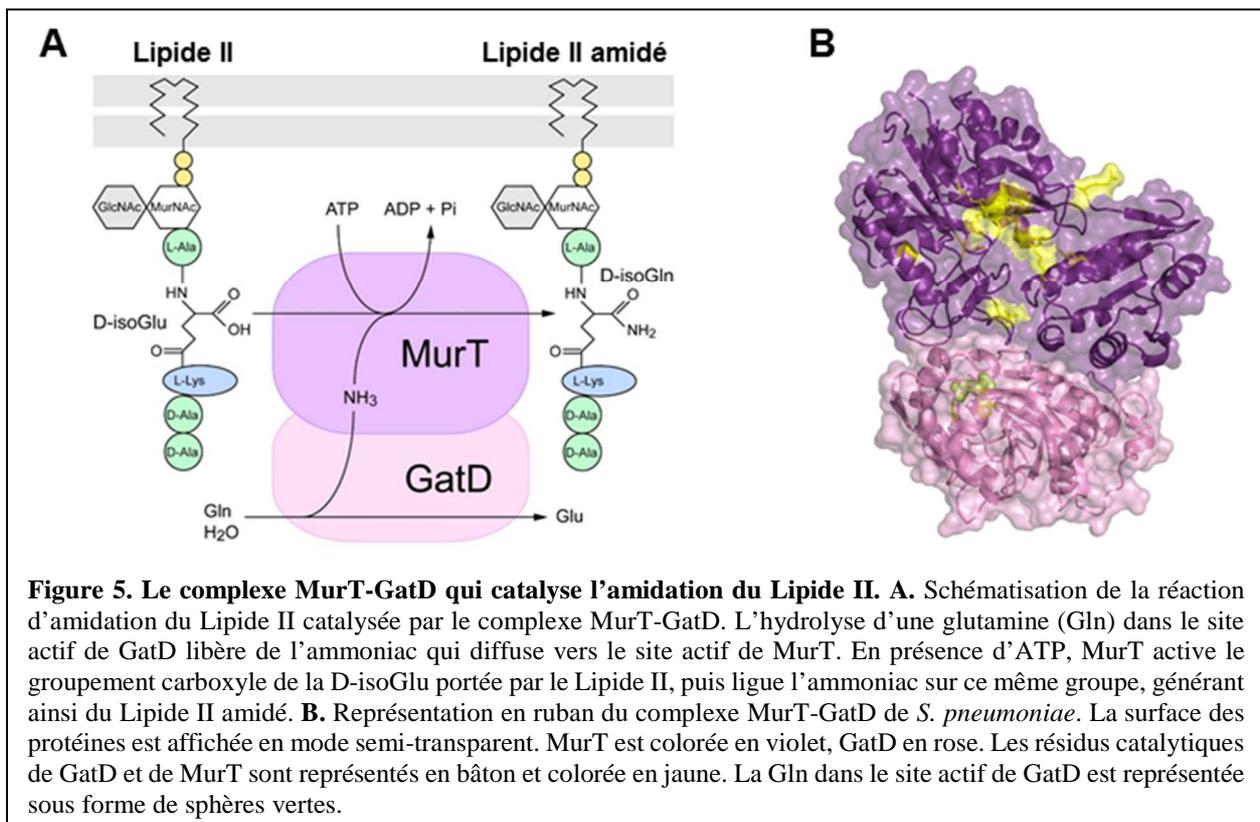
Chez les bactéries à Gram positif, la réticulation des chaînes peptidiques du PG par les PBPs nécessite la présence d'une D-isoglutamine (iGln) en 2<sup>ème</sup> position. Cette iGln résulte de la transformation d'un D-glutamate (Glu) en iGln, une réaction catalysée dans le cytoplasme par un complexe de deux protéines, **MurT** et **GatD** (Münch et al., 2012; Zapun et al., 2013). La glutaminase GatD transfère un groupement amine porté par une Gln vers le site actif de la ligase MurT qui, après phosphorylation du Lipide II, lie le groupement amine sur le résidu Glu en 2<sup>ème</sup> position de la chaîne peptidique du Lipide II (Fig. 5A). Cette réaction est essentielle à la survie du pneumocoque (données non publiées, communiquées par L. Harvarstein) et constitue donc une cible thérapeutique potentielle.

L'étude du complexe MurT-GatD est menée dans le laboratoire par A. Zapun qui m'a sollicitée au début de l'année 2014 pour cristalliser le complexe et résoudre sa structure cristallographique. J'ai donc pris en charge l'étude structurale de MurT-GatD, ce qui a inclus la supervision d'une étudiante en BTS (Jennifer Galindo) et d'une technicienne (Charlène Thedevuide). Nous avons obtenu des cristaux du complexe qui diffractaient à 6 Å, puis à 2.9 Å après optimisation de leurs conditions de croissance et de congélation. J'ai résolu cette structure par la méthode SIRAS (Single Isomorphous Replacement with Anomalous Signal) à partir de données natives et anormales collectées sur des cristaux natifs et des dérivés sélénisés.

La structure du complexe a révélé une interface composée de deux régions, l'une majoritairement hydrophobe et l'autre renfermant majoritairement des interactions électrostatiques. Le site actif de GatD,

qui abrite une Gln dans la forme cristallisée du complexe, se situe entre ces deux régions de contact et s'ouvre vers l'une des entrées de la cavité enzymatique de MurT (Fig. 5B). La sortie du site actif de GatD et l'entrée de celui de MurT sont toutefois bloquées par la présence de résidus portant des chaînes latérales volumineuses et potentiellement par la présence d'une boucle flexible chez MurT. Ces observations suggèrent que l'activité du complexe MurT-GatD pourrait être régulée de façon similaire à d'autres complexes glutaminase-synthase: sans la présence du Lipide II dans le site actif de MurT, la sortie du site actif de GatD resterait bloquée, inhibant son activité glutaminase (List et al., 2012). L'arrivée du Lipide II induirait un changement conformationnel de GatD et MurT, libérant l'entrée du site actif de MurT et la sortie de celui de GatD, activant ainsi l'activité glutaminase de cette dernière et permettant la diffusion de l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) de GatD vers MurT. Des tests d'activité enzymatique réalisés *in vitro* avec des mutants de GatD et de MurT, ainsi que la caractérisation (viabilité, croissance et morphologie) de souches de *S. pneumoniae* exprimant ces mêmes mutants sont en cours pour tester notre modèle.

La réaction catalysée par le complexe MurT-GatD est essentielle à la survie de la bactérie et ce complexe est conservé chez des espèces pathogènes très importantes (*S. aureus*, *M. tuberculosis*). Le complexe MurT-GatD constitue de ce fait une nouvelle cible antibactérienne potentielle et l'obtention de sa structure cristallographique constitue la première étape vers la recherche de molécules inhibitrice à effet antibactérien.



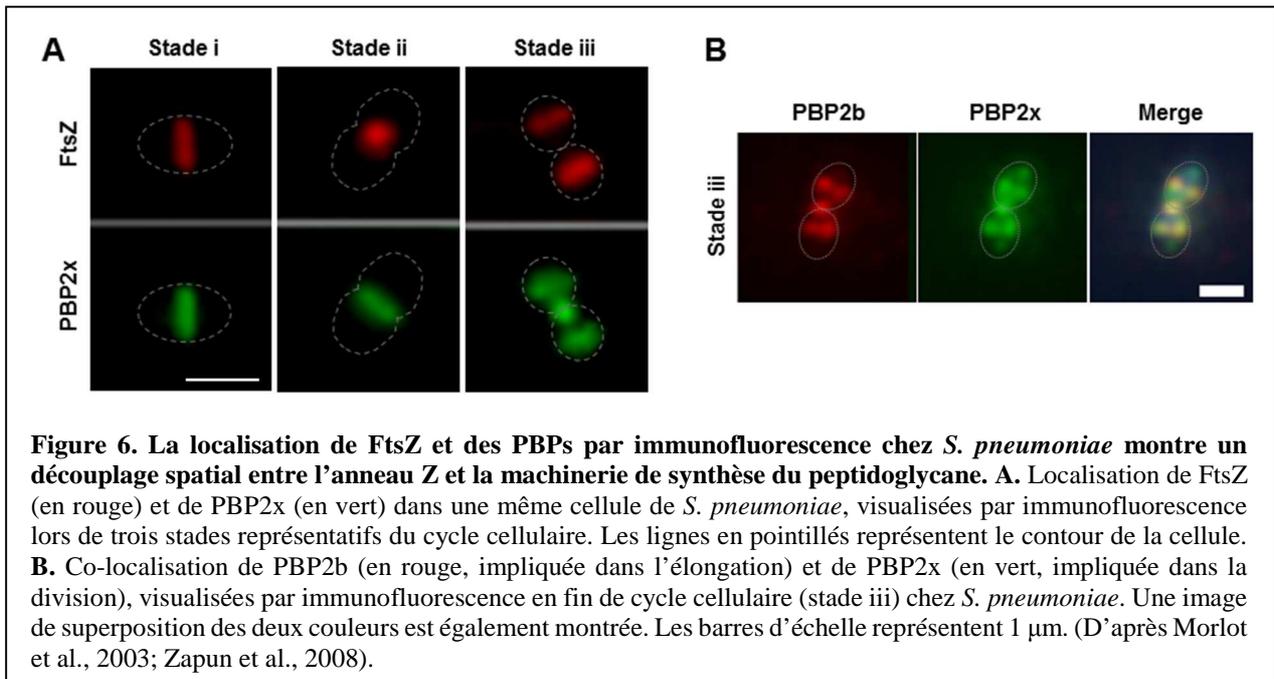
## **b. Assemblage des machineries morphogénétiques: localisation cellulaire à basse résolution**

Contexte temporel et financier: travaux de thèse (IBS, Grenoble). Bourse de thèse du CEA (Commissariat aux Energies renouvelables et Alternatives) (2000-2003).

Au cours de ma thèse j'ai étudié la dynamique de synthèse du PG chez le pneumocoque à travers la localisation cellulaire de ses cinq PBPs de haut poids moléculaire (les synthèses du PG: PBP1a, PBP2a, PBP1b, PBP2x et PBP2b) dans des souches sauvage et mutantes. L'objectif de ces travaux était de déterminer la position des sites de synthèse du PG et l'interdépendance spatio-temporelle des PBPs au cours du cycle cellulaire. A cette fin, j'ai développé l'usage de l'**immunofluorescence** chez le pneumocoque et marqué simultanément l'ADN chromosomique, une PBP et FtsZ.

J'ai montré que toutes les PBPs de haut poids moléculaire du pneumocoque adoptent des structures d'apparence annulaire au site de division, révélant des similitudes nouvelles entre les mécanismes de division et de morphogénèse des bactéries de type bacilles et coques (Morlot et al., 2003). Par ailleurs, le double marquage fluorescent des PBPs avec la protéine FtsZ m'a permis de montrer que ces protéines co-localisent au début du cycle cellulaire, mais que la localisation des PBPs est retardée par rapport à celle de FtsZ au cours de la constriction, mettant en évidence un découplage temporel entre la synthèse du PG catalysée par les PBPs et la constriction de la membrane assurée par FtsZ (Fig. 6) (Morlot et al., 2003). Cette observation a remis en cause l'existence d'un complexe macromoléculaire unique impliqué dans la division, et a fait apparaître un processus beaucoup plus dynamique que celui généralement décrit dans la littérature.

Ces travaux en immunofluorescence, que j'ai initiés à l'issue du 1<sup>er</sup> semestre de ma thèse, constituaient un réel défi à cette époque et ont nécessité un important travail de mise au point. Ils ont constitué la première étude de localisation cellulaire en microscopie en fluorescence conventionnelle chez le pneumocoque et ont inspiré d'autres études de localisation chez cette bactérie, dans notre laboratoire, mais également dans des laboratoires étrangers. Depuis, l'usage de protéines de fusion entre la protéine d'intérêt et une protéine fluorescente (GFP ou autre) s'est développé chez le pneumocoque mais la méthode d'immunofluorescence est encore utilisée aujourd'hui lorsque l'expression d'une fusion entre la protéine d'intérêt et une protéine fluorescente est problématique. C'est très probablement le succès de ce projet de thèse qui a encouragé et conforté ma décision de mettre au point l'usage de la technique de microscopie super-résolue PALM (PhotoActivated Localization Microscopy) lorsque je suis revenue dans le groupe Pneumocoque après mon recrutement au CNRS.



### c. Assemblage des machineries morphogénétiques: localisation cellulaire à haute résolution

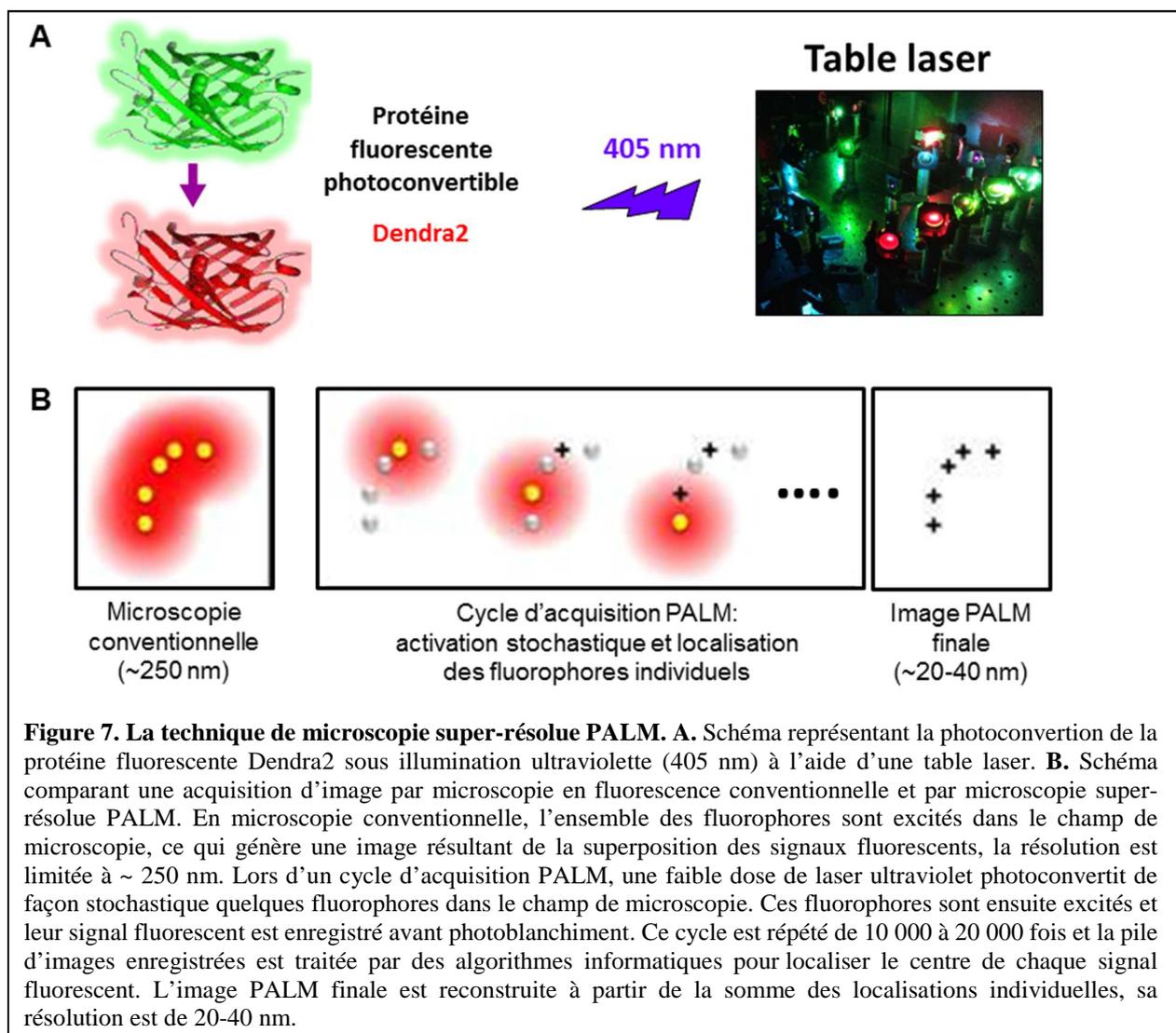
Contexte temporel et financier: travaux présent (IBS, Grenoble). Encadrement de la thèse de M. Jacq (2012-2016) et de C. Arthaud (Depuis 2015). Financement ANR NOBLEACH (2012-2014, coordonnées par D. Bourgeois), fond d'intervention UJF (2012, coordinatrice), Labex GRAL (2012-2015, coordinatrice).

Collaboration: locale, avec D. Bourgeois et V. Adam (Equipe Pixel, IBS, Grenoble).

La diffraction de la lumière limite la résolution de la microscopie en fluorescence conventionnelle à ~250 nm, ce qui représente environ un quart de la taille moyenne d'une bactérie et restreint donc l'observation des structures protéiques *in vivo*. Cette résolution est d'autant plus limitante lorsque la grande majorité des protéines étudiées se localisent dans une même région (le site de division pour les protéines morphogénétiques du pneumocoque). Dans les 10 dernières années, l'émergence de techniques de microscopie super-résolue a rendu possible la détermination à haute résolution de la localisation de protéines dans la cellule, révélant la structure *in vivo* de gros assemblages moléculaires à l'échelle nanométrique. Chez les bactéries, la technique de microscopie super-résolue utilisée avec le plus grand succès est le PALM (PhotoActivated Localization Microscopy) (Cattoni et al., 2012; Coltharp and Xiao, 2012).

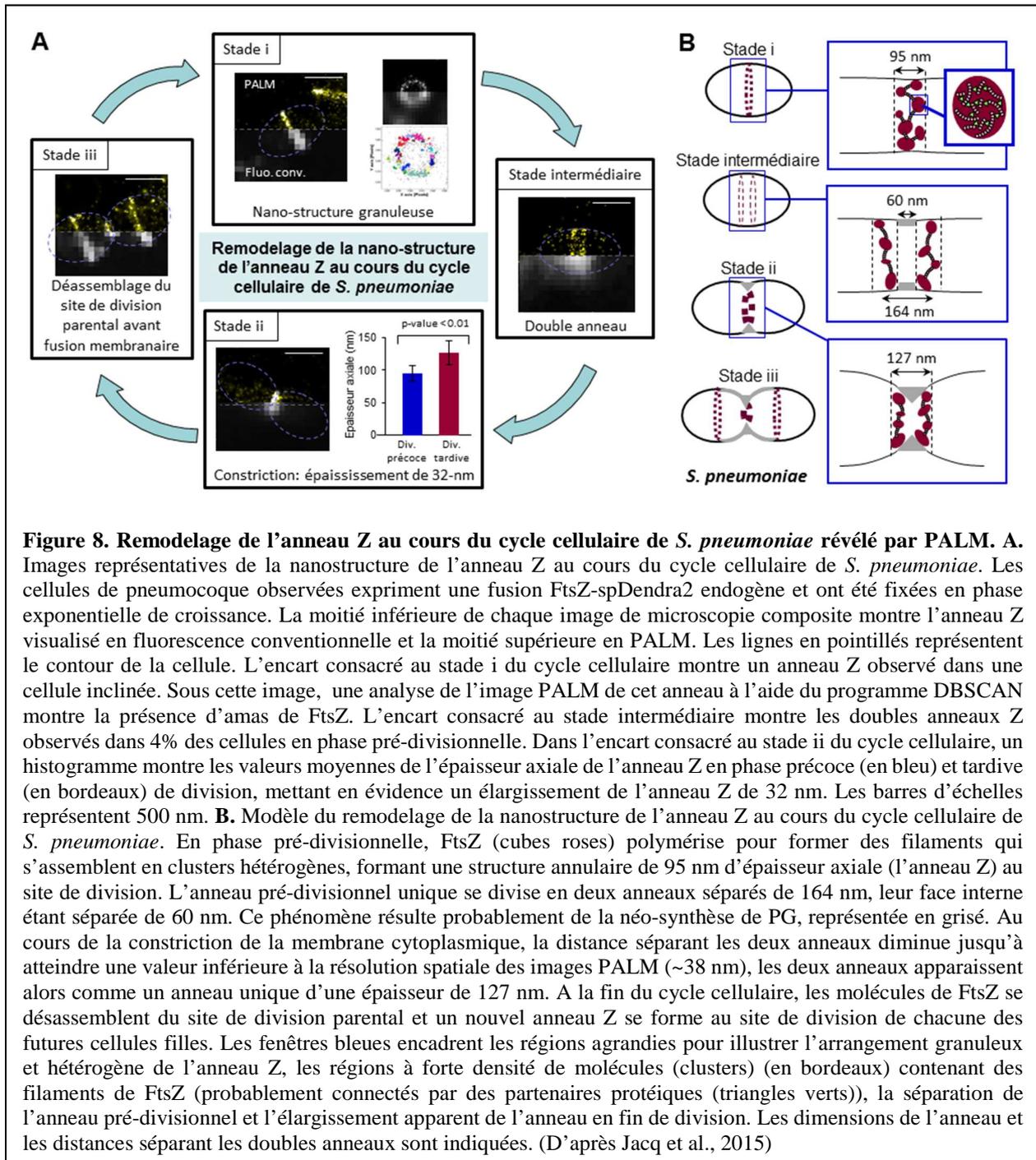
Le PALM est basé sur la détection de molécules uniques et la localisation du centre de chacun des signaux fluorescents (Sengupta et al., 2014). Cette technique nécessite l'utilisation de protéines fluorescentes phototransformables qui, sous illumination ultraviolette (405 nm), vont acquérir la capacité à fluorescer (protéines photoactivables) ou changer de spectre d'émission (protéines

photoconvertibles) (Fig. 7A). L'utilisation d'une faible dose de laser à 405 nm confère un caractère stochastique au phénomène de phototransformation et permet de détecter à chaque cycle d'acquisition des molécules différentes (Fig. 7B). Un cycle d'acquisition consiste ainsi à phototransformer quelques molécules fluorescentes dans le champ de microscopie, exciter leur fluorescence à l'aide d'un laser dit d'"excitation", enregistrer les signaux fluorescents et photoblanchir les molécules excitées. Ce cycle est répété de 10 000 à 20 000 fois, jusqu'à ce que l'intégralité des protéines fluorescentes présentes dans le champ de microscopie aient été imagées. Les images sont ensuite traitées à l'aide d'algorithmes informatiques qui déterminent la position de chacun des signaux fluorescents avec une précision pouvant atteindre 10 nm et une image finale est reconstruite à partir de la somme des localisations (Fig. 7B). La résolution spatiale de l'image PALM finale est généralement comprise entre 20 et 40 nm, elle dépendra de la densité spatiale des molécules imagées, du nombre de photons collectés (qui doit être haut) et du bruit de fond (qui doit être bas).



Bien qu'une demi-douzaine d'études utilisant le PALM chez des bactéries aient été publiées dans la littérature (Cattoni et al., 2012; Coltharp and Xiao, 2012) lorsque j'ai initié ce projet, son utilisation chez le pneumocoque n'avait pas encore été rapportée. La petite taille de cette bactérie en fait un organisme difficile à observer en microscopie et augmentait la difficulté du projet, mais cette petite taille en fait également un organisme pour lequel il est particulièrement intéressant de développer une technique de microscopie super-résolue telle que le PALM. J'ai par ailleurs diminué le niveau de risque en m'engageant dans une collaboration avec des biophysiciens experts dans le domaine de la photophysique des protéines fluorescentes (D. Bourgeois et V. Adam, équipe Pixel, IBS) et ce projet a bénéficié de plusieurs financements, dont une bourse de thèse pour un étudiant (M. Jacq) que j'ai supervisé de façon théorique et pratique au quotidien, en collaboration avec V. Adam et D. Bourgeois.

Notre premier objectif était d'identifier une protéine fluorescente photoconvertible utilisable chez le pneumocoque et de parvenir à la détecter en molécule unique. Nous avons sélectionné la protéine photoconvertible Dendra2 qui présente l'avantage d'être monomérique ; nous avons optimisé sa séquence nucléique (usage des codons) pour une expression chez *S. pneumoniae* et remplacé ses extrémités N- et C-terminales par celles de la GFP car cette méthode permet parfois d'améliorer la stabilité des protéines de fusion fluorescentes (Shaner et al., 2004). La protéine ingénierée a été nommée spDendra2 et nous avons choisi de réaliser notre première étude PALM en la fusionnant à FtsZ, dont la fonction est d'échafauder la machinerie de division et de synthèse de la paroi, et de contribuer à la constriction membranaire. Cette protéine constituait un modèle d'étude idéal car elle est soluble et abondante ; il était par ailleurs essentiel de connaître l'architecture de l'anneau Z puisqu'il est à la base de l'assemblage des machineries morphogénétiques. Nous avons d'abord vérifié que la protéine de fusion entre FtsZ et spDendra2 était fonctionnelle en analysant la vitesse de croissance et morphologie de la souche de pneumocoque exprimant une fusion FtsZ-spDendra2 sous contrôle du promoteur endogène et en déterminant la localisation de cette protéine de fusion à basse résolution. Pour obtenir un rapport signal/bruit optimal, nous avons ensuite optimisé de nombreux paramètres expérimentaux tels que le milieu de croissance des cellules, le protocole de fixation des cellules, le support d'observation des cellules vivantes ou les conditions d'acquisition de données PALM (puissance des lasers, mode et durées d'acquisition). L'optimisation de tous ces paramètres nous a permis d'obtenir des données PALM d'excellente qualité, à une résolution spatiale de 20-40 nm, sur des cellules fixées ou vivantes exprimant la protéine FtsZ fusionnée à spDendra2 de façon endogène ou ectopique.



La détermination de la nanostructure PALM de l'anneau Z révélé une structure granuleuse hétérogène, faite de régions à forte densité de molécules alternant avec des régions dont la densité est de 4 à 10 fois inférieure (Fig. 8A). La quantification des molécules imagées indique que les régions de forte densité sont des amas protéiques contenant entre 50 et 150 molécules de FtsZ-spDendra2. La simulation *in silico* d'une expérience PALM sur un anneau Z continu et homogène a montré que les amas observés expérimentalement ne résultent pas d'un artefact d'imagerie ou de reconstruction de l'image PALM. La structure granuleuse de l'anneau Z est donc très certainement réelle. Cet aspect granuleux avait déjà été rapporté chez les bactéries modèles *E. coli* et *C. crescentus*, il semble donc qu'il

constitue un caractère conservé de l'anneau Z chez différentes espèces bactériennes (Biteen et al., 2012; Fu et al., 2010; Holden et al., 2014).

Sur la base de la longueur des cellules, du diamètre et de l'architecture de l'anneau Z, les cellules observées ont été classées en trois catégories caractéristiques des principales étapes du cycle cellulaire (assemblage de l'anneau au site de division de la cellule mère (stade i), constriction (stade ii) et repositionnement au site de division des futures cellules filles (stade iii)) (Fig. 8A). La mesure des dimensions de l'anneau Z a montré qu'au début du cycle cellulaire, la largeur axiale de l'anneau Z est d'environ 95 nm et qu'elle augmente de 32 nm en cours de constriction (Fig. 8A). Nous avons quantifié le nombre de molécules imagées au site de division et montré ainsi que l'anneau Z contient un nombre constant de molécules au cours de sa constriction. L'élargissement de l'anneau ne résulte donc pas du recrutement de molécules additionnelles mais du réarrangement spatial des molécules de FtsZ au sein de l'anneau. Une observation surprenante a permis de proposer un modèle pouvant expliquer cet élargissement : il s'agit d'une structure en double anneau, qui est observée dans 4% des cellules en phase pré-divisionnelle (Fig. 8A). Les caractéristiques de ces anneaux doubles (dimensions, nombre de molécules imagées) suggèrent qu'ils constituent une structure transitoire, résultant probablement de la division de l'anneau Z initial (stade i) et précédant la phase de constriction (stade ii). Si cette structure en double anneau est stable, il est possible que la constriction de la membrane entraîne le rapprochement des deux anneaux et que l'élargissement de l'anneau Z observé en fin de division soit dû à la présence de deux anneaux non résolus. L'ensemble de nos observations ont été intégrées dans un modèle décrivant le remodelage de l'anneau Z au cours du cycle cellulaire (Fig. 8B) et ces travaux ont été publiés dans un manuscrit signé en premier auteur par mon étudiant en thèse et en dernier et correspondant auteur pour ma part (Jacq et al., 2015).

La technique de PALM n'avait jamais été adaptée à des bactéries coccoïdes ou ovococcoïdes telles que *S. pneumoniae*. L'absence d'études PALM réalisées chez ces microorganismes, qui incluent de nombreux pathogènes humains, reflète certainement les difficultés techniques que nous avons rencontrées au cours de nos travaux chez *S. pneumoniae*. La protéine fluorescente photoconvertible que nous avons optimisée sera utile à la communauté des microbiologistes. Nos travaux sont par ailleurs les premiers à utiliser une fusion endogène entre FtsZ et une protéine photoconvertible, permettant d'obtenir des données dans des conditions relativement physiologiques. Nos travaux ont généré des informations fondamentales concernant une protéine essentielle à la division bactérienne, FtsZ, qui a été reconnue comme cible antibactérienne prometteuse. Ils devraient motiver l'usage du PALM chez d'autres coques pathogènes tels que les staphylocoques ou les entérocoques.

#### **d. Assemblage des machineries morphogénétiques: rôle de la kinase StkP**

Contexte temporel et financier: travaux présents (IBS, Grenoble). Financement ANR PiBaKi (2013-2016, coordonné par C. Grangeasse, MMSB, Lyon).

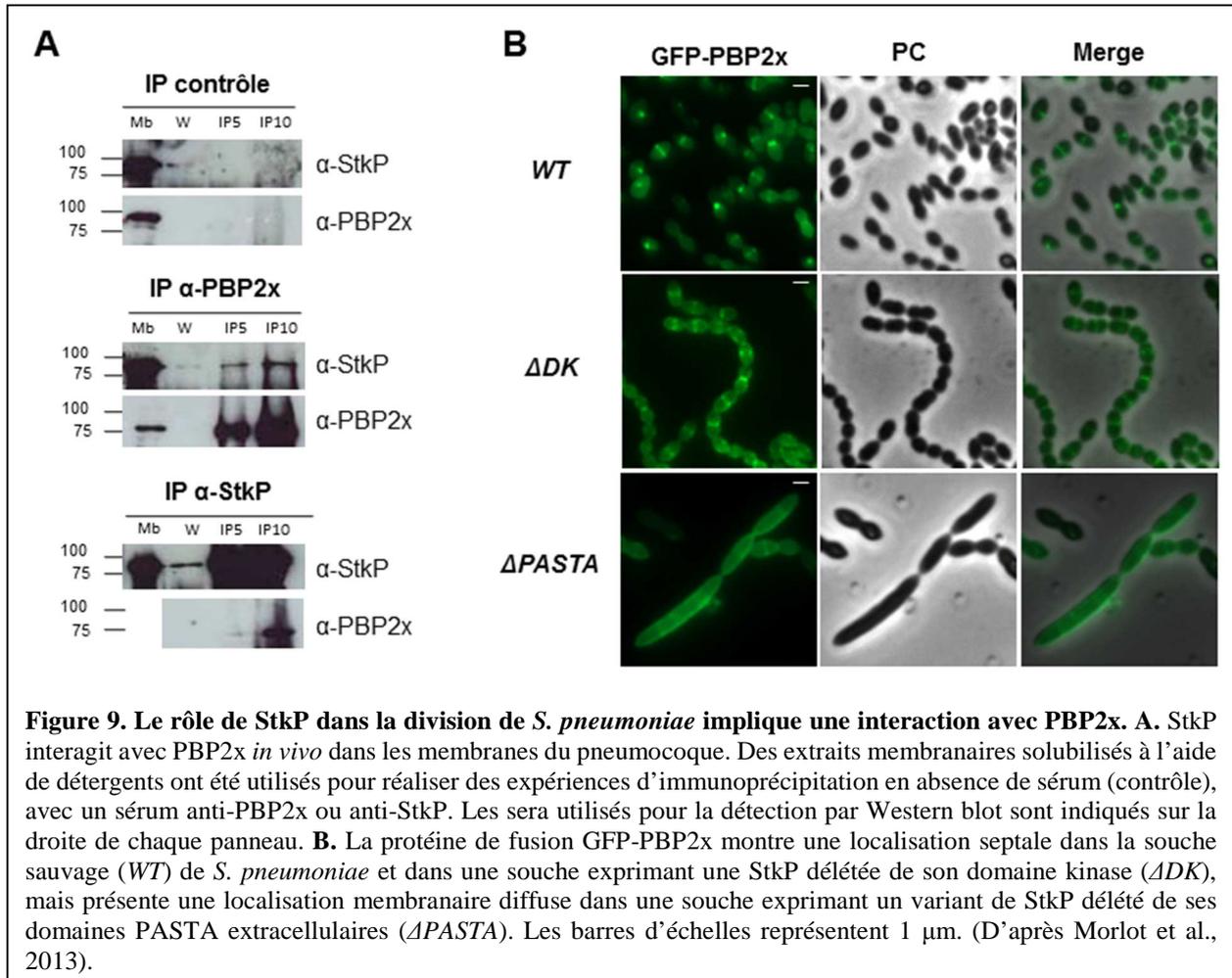
Collaboration: nationale, avec l'équipe de C. Grangeasse (MMSB, Lyon), impliquant également A.M. Di Guilmi au sein du groupe Pneumocoque (IBS).

La compréhension des mécanismes d'assemblage des machineries morphogénétiques passe par l'étude de la localisation cellulaire de ses composants, mais également par l'étude du rôle de protéines régulatrices telle que la Ser/Thr kinase StkP. Lorsque j'ai débuté cette étude, l'équipe de C. Grangeasse à Lyon (MMSB) avait montré que la délétion ou la mutation de différents domaines de StkP entraîne des défauts morphologiques qui traduisent un arrêt de la synthèse de PG septal ou périphérique (Fig. 3C) (Fleurie et al., 2012). Nous savions donc que StkP avait une fonction de régulation de l'élongation et de la division du pneumocoque. L'objectif de cette étude était d'explorer un des mécanismes moléculaires à la base de cette fonction régulatrice de StkP. J'ai été intégrée à ce projet lorsque j'ai proposé de tester l'interaction directe entre StkP et son partenaire PBP2x par thermophorèse et d'étudier la fonction de cette interaction par diverses méthodes (localisation par microscopie en fluorescence conventionnelle, test d'activité de PBP2x et de StkP).

En utilisant une combinaison de techniques de génétique (mutants de délétion), de biochimie (immunoprécipitations, ELISA, thermophorèse, ...) et de microbiologie cellulaire (microscopie en fluorescence conventionnelle), nous avons généré des données complémentaires qui suggèrent que le mécanisme à la base du rôle régulateur de StkP implique un acteur majeur de la synthèse de PG septal, la transpeptidase PBP2x. Nos travaux ont montré que StkP et PBP2x forment un complexe ancré dans les membranes du pneumocoque (Fig. 9A) (Morlot et al., 2013). A l'occasion de cette étude, je me suis formée à la technique de thermophorèse à micro-échelle (**MST** pour "**MicroScale Thermophoresis**"), qui permet l'analyse quantitative d'interactions moléculaires en solution à l'échelle du microlitre (Jerabek-Willemsen et al., 2011). Cette technique a montré que StkP et PBP2x interagissent directement *in vitro*. Cette interaction est médiée par les domaines extracellulaires PASTA de StkP et la région extracellulaire de PBP2x contenant le domaine TP. Par microscopie en fluorescence conventionnelle, nous avons montré que StkP et PBP2x adoptent toutes les deux un profil de localisation tardif au site de division et que la localisation de PBP2x dépend de la présence des domaines extracellulaires PASTA de StkP (Fig. 9B) (Morlot et al., 2013). Aucune modification de la capacité de PBP2x à se lier aux  $\beta$ -lactamines, hydrolyser un analogue de substrat ou catalyser *in vitro* la transpeptidation de chaînes glycanes n'a été détectée en présence de StkP. Il est toutefois possible qu'une telle régulation se fasse *in vivo*. Alternativement, l'interaction entre StkP et PBP2x pourrait être uniquement un prérequis structural pour l'assemblage d'une machinerie de division fonctionnelle.

Cette étude a permis la première mise en évidence d'une interaction entre une Ser/Thr kinase et une PBP. Le fait que PBP2x ne soit pas phosphorylée par StkP mais que sa localisation requiert une

interaction avec la kinase montre par ailleurs que le rôle de StkP n'est pas limité à sa fonction de kinase, mais qu'elle possède également un rôle structural dans l'assemblage des machineries morphogénétiques. Certains des outils fluorescents développés au cours de ces travaux ont été utilisés par l'équipe de C. Grangeasse dans une étude visant à décrire d'autres interactions moléculaires établies au sein des machineries morphogénétiques (Fleurie et al., 2014b).



#### e. Hydrolyse ménagée du PG: rôle des hydrolases de la paroi

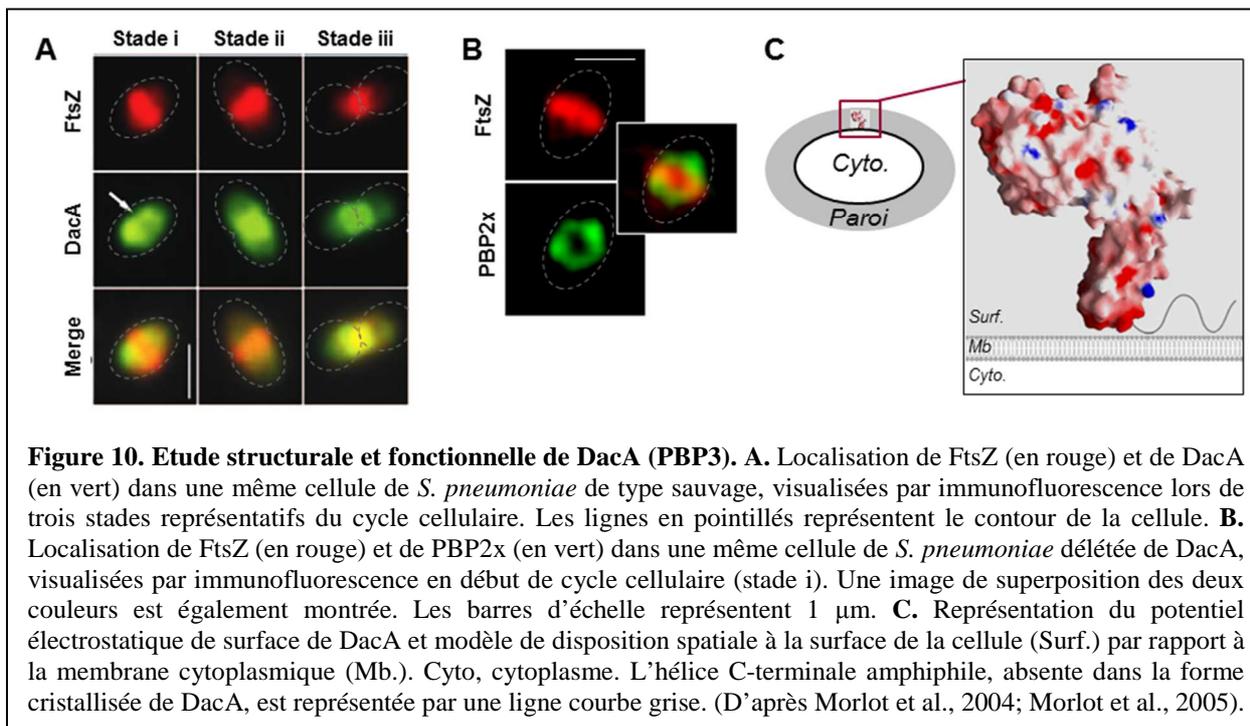
Durant les 50 dernières années, les PBPs ont été intensivement étudiées du fait qu'elles soient la cible primaire des  $\beta$ -lactamines. En revanche, le rôle des hydrolases de la paroi (CWHs pour "Cell Wall Hydrolases") dans la morphogénèse et la division bactérienne est relativement mal connu bien que nécessaire au bon déroulement de ces processus. C'est pour cette raison que j'ai étudié ces protéines au cours de mes travaux doctoraux, post-doctoraux et présents.

## **i. Etude structurale et fonctionnelle de DacA**

Contexte temporel et financier: travaux de thèse (IBS , Grenoble). Bourse de thèse du CEA (2000-2003).

Lorsque j'ai débuté ma thèse, la seule hydrolase connue pour être impliquée dans la morphogénèse du pneumocoque était la D,D-carboxypeptidase DacA (PBP3). L'inactivation de cette enzyme chez *E. coli* était connue pour causer une modification de la composition du PG, ainsi que des aberrations morphologiques (Nelson and Young, 2001). Une relation de cause à effet existait certainement entre ces deux caractéristiques sans que l'on comprenne par quel biais les D,D-CPases assuraient le déroulement correct de la division bactérienne. Pour mieux comprendre ce mécanisme au niveau cellulaire, j'ai dans un premier temps étudié la localisation cellulaire de DacA à basse résolution en appliquant la méthode d'immunofluorescence mise au point avec les PBPs de haut poids moléculaire (Morlot et al., 2003). Cette étude a montré qu'en phase pré-divisionnelle, PBP3 présente une localisation bi-hémisphérique : elle se localise de manière diffuse sur toute la cellule excepté au site de division (Fig. 10A). Puis très rapidement, elle migre vers la zone de néo-synthèse du PG. Tous les tests d'interaction entre DacA et les PBPs de haut poids moléculaire ont été infructueux mais en revanche, j'ai montré qu'en absence de DacA, l'anneau Z et les PBPs ne s'assemblent plus sur le même plan au début du cycle cellulaire (Fig. 10B). Nous avons proposé un modèle dans lequel au début du cycle cellulaire, PBP3 cliverait les substrats pentapeptidiques des PBPs sur l'ensemble de la surface de la bactérie excepté au site de division, suggérant que les PBPs soient guidées par la présence de leur substrat (Morlot et al., 2004). Au cours de la constriction, PBP3 régulerait ensuite le degré de polymérisation du PG néo-synthétisé. Lorsque PBP3 est inactivée, la présence de pentapeptides sur l'intégralité de la surface cellulaire autoriserait le positionnement des structures annulaires formées par les PBPs sur n'importe quel plan de la cellule.

Stimulée par l'importance de cette enzyme pour la division du pneumocoque, j'en ai entrepris sa caractérisation biochimique et structurale. J'ai ainsi résolu la structure tridimensionnelle de PBP3 à 2.8 Å de résolution par la méthode MAD ("Multi-wavelength Anomalous Diffraction") après cristallisation d'un dérivé sélénié de la protéine. PBP3 est composée d'un domaine N-terminal portant l'activité D,D-CPase et d'un domaine C-terminal de fonction encore inconnue et composé exclusivement de feuillets  $\beta$  (Morlot et al., 2005). Nous avons également montré que PBP3 possède une forte activité D,D-CPase, probablement liée à son rôle de régulateur de la réticulation du PG. J'ai proposé un modèle de disposition spatiale dans lequel PBP3 s'orienterait perpendiculairement à la membrane cytoplasmique (Fig. 10C). Dans cette disposition, le domaine C-terminal jouerait le rôle d'un piédestal permettant de rapprocher suffisamment le site actif des couches de PG pour que la protéine y exerce son activité hydrolytique.



## ii. Etude fonctionnelle de Pmp23

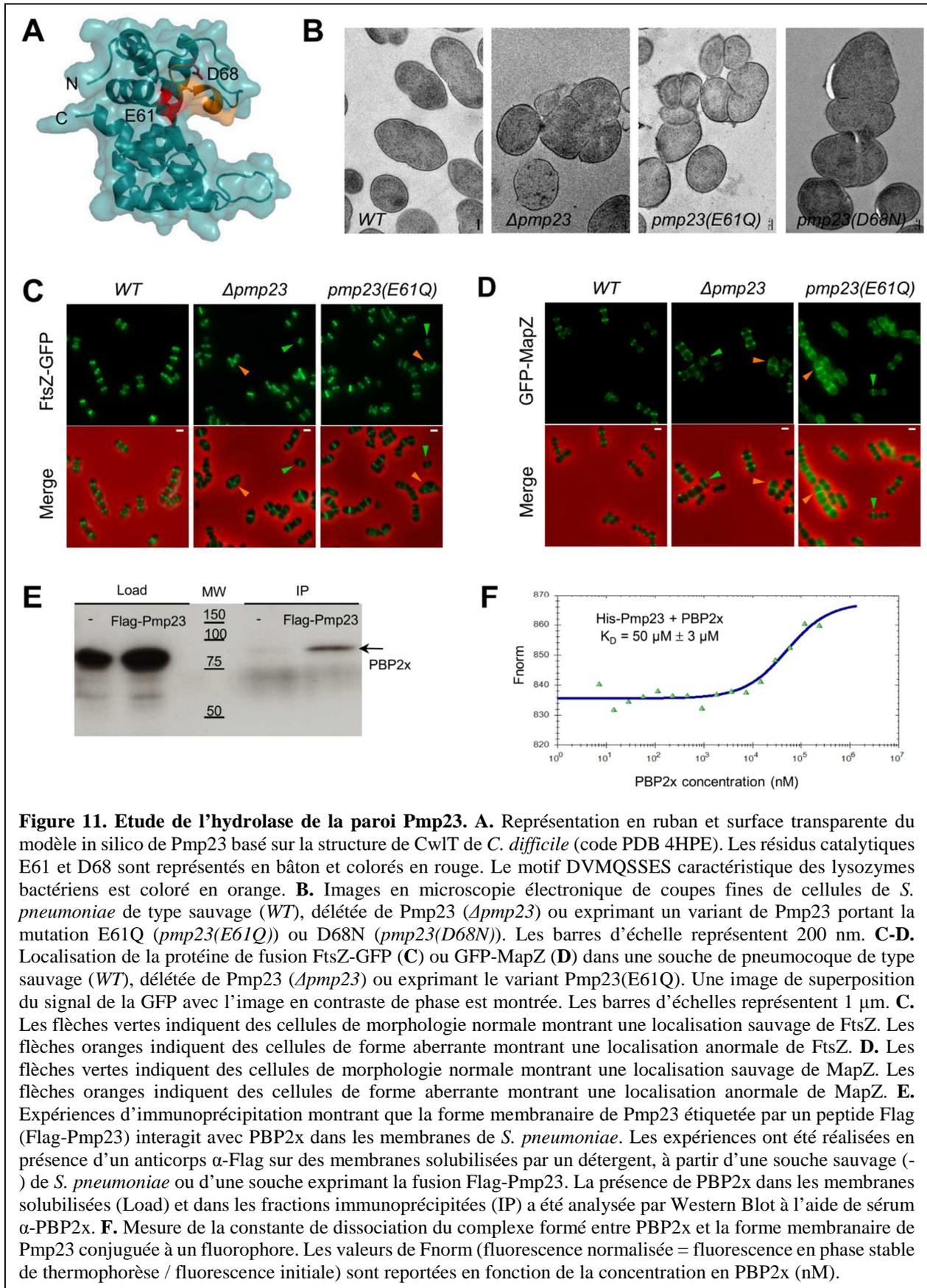
Contexte temporel et financier: travaux présent (IBS, Grenoble). Encadrement de la thèse de M. Jacq (2012-2016) et du stage de M2 de C. Arthaud (2015).

L'implication de Pmp23 dans la morphogénèse et la division du pneumocoque a été identifiée en 2008 lorsque notre laboratoire a mis en évidence des défauts de forme et de division en son absence (Pagliero et al., 2008). Après mon recrutement au CNRS, j'ai souhaité approfondir cette étude pour comprendre le rôle de cette CWH dans la morphogénèse et la division de *S. pneumoniae*. Ces travaux ont été réalisés sous ma supervision par mon étudiant en thèse, M. Jacq, et par C. Arthaud au cours de son stage de M2. Une analyse bio-informatique a montré que les plus proches homologues structuraux de Pmp23 sont les domaines lysozyme bactériens des protéines CwIT de *Staphylococcus aureus* et *Clostridium difficile* (codes PDB 4FDY et 4HPE) (Xu et al., 2014), suggérant que Pmp23 possède une activité N-acetylmuramidase qui clive les liaisons entre le MurNAc et le GlcNAc dans les chaînes de sucre du PG. Nous avons modélisé in silico la structure de Pmp23 sur la base de la structure de ses homologues CwIT et identifié ainsi les résidus catalytiques principaux (E61 et D68) (Fig. 11A). Nous avons purifié la forme complète membranaire de Pmp23 en présence de détergents et montré que Pmp23 est capable de se lier au PG *in vitro*. Nous n'avons toutefois pas détecté d'activité hydrolytique sur diverses préparations de PG de *S. pneumoniae* (avec ou sans acides téichoïques, N-acétylés / O-déacétylés ou N-déacétylés / O-acétylés), probablement parce que les détergents inhibent l'activité enzymatique de la protéine. En revanche, la mutation *in vivo* des deux principaux résidus catalytiques (E61Q et D68N) de Pmp23 a causé les mêmes défauts de forme et de division que la délétion de la

protéine, indiquant que Pmp23 est un lysozyme actif *in vivo* (Fig. 11B). Nos données indiquent également que l'inactivation de Pmp23 cause une instabilité de l'anneau Z dans le cytoplasme, associée à une délocalisation partielle de MapZ (Fig. 11C-D), une protéine impliquée dans le positionnement de FtsZ au site de division et dont la localisation est dépendante de son domaine de liaison au PG (Fleurie et al., 2014a).

Ces données suggèrent un premier modèle dans lequel l'activité hydrolytique de Pmp23 aurait un rôle de maturation du PG qui serait important pour la localisation et la stabilité des structures formées par MapZ au site de division. Toutefois, la capacité de MapZ à se lier au PG n'est pas affectée lorsque ce dernier n'est pas modifié par Pmp23. Nos données sont donc plus compatibles avec un modèle dans lequel Pmp23 aurait une fonction de "contrôle qualité" visant à corriger des erreurs introduites par les PBPs lors de la synthèse du PG. Ce modèle est supporté par le fait que Pmp23 interagisse directement avec la synthase du PG PBP2x (Fig. 11E-F) et que le PG présente un plus fort taux de réticulation lorsque Pmp23 est délétée. Dans ce modèle, la présence de chaînes de sucre improprement incorporées au PG préexistant (réticulation excessive, orientation incorrecte, ...) entraînerait la délocalisation partielle de MapZ à moins qu'elles ne soient dégradées par Pmp23. Ce second modèle est consistant avec le fait que MapZ se délocalise lorsque la synthèse du PG est perturbée (Fleurie et al., 2014a). En absence du contrôle qualité effectué par Pmp23, la délocalisation de MapZ causerait une délocalisation subtile de FtsZ et des PBPs, causant dans un premier de légers défauts de forme. Ces légers défauts de localisation et de formes seraient ensuite rapidement amplifiés par la synthèse de PG active, menant à une structure anormale du complexe de division et des défauts morphologiques sévères. La raison pour laquelle MapZ se délocalise en absence de Pmp23 reste toutefois à élucider.

De nombreuses études supportent l'idée que les protéines précoces de division telles que FtsZ guident la localisation et l'assemblage de la machinerie de synthèse du PG, qui incluent les synthases et les hydrolases du PG. Ces travaux révèlent une nouvelle interaction fonctionnelle entre le métabolisme du PG et la division cellulaire et suggèrent que bien que la plupart des CWHs ne soient pas essentielles à la survie des bactéries, elles pourraient constituer d'importants dispositifs de sécurité qui permettent le bon déroulement de la division cellulaire. Ces résultats sont présentés dans un manuscrit signé en premier auteur par mon étudiant en thèse (M. Jacq), en deuxième auteur par mon étudiant en M2 (C. Arthaud, actuellement en thèse sous ma supervision) et en dernier et correspondant auteur pour ma part. Ce manuscrit est en cours de révision dans le journal mBio (Jacq et al.).



## B. Division chez *E. coli*

### 1. Introduction

Mon intérêt pour les hydrolases de la paroi et mon expérience post-doctorale à Boston a fait naître à mon retour en France une collaboration avec l'équipe de Thomas Bernhardt de la Harvard Medical School de Boston. Ce projet a pour but de comprendre le mécanisme d'activation des hydrolases de la paroi **AmiA, B et C** par les **facteurs LytM (EnvC et NlpD)** au cours de la division chez *E. coli*. AmiA-C sont des *N*-acetylmuramyl L-alanine amidases qui clivent la liaison amide entre les chaînes de sucre et de peptide du PG. Les facteurs LytM possèdent un domaine homologue à l'endopeptidase LytM qui clive les ponts Gly-Gly reliant les chaînes peptidiques du PG de *S. aureus*. Les domaines LytM de EnvC et NlpD n'ont pas d'activité enzymatique mais sont nécessaires à l'activation de l'activité amidase de AmiA, AmiB et AmiC (Uehara et al., 2009, 2010). En l'absence des protéines AmiA, B et C, ou en l'absence des protéines EnvC et NlpD, les cellules d'*E. coli* se divisent mais ne se séparent pas (Fig. 12A-B) (Heidrich et al., 2001; Uehara et al., 2009, 2010). Localisée au site de division, l'interaction entre les protéines AmiA-C et les facteurs LytM est nécessaire au clivage du PG septal et à la séparation des cellules filles. En effet, en absence des facteurs LytM, l'activité de AmiA-C est inhibée par une hélice auto-inhibitrice qui occlue leur site actif et prévient l'hydrolyse non contrôlée de la paroi et la lyse cellulaire (Yang et al., 2012). L'objectif de cette collaboration est donc de déterminer les bases moléculaires de l'activation des amidases par les facteurs LytM.

### 2. Travaux réalisés

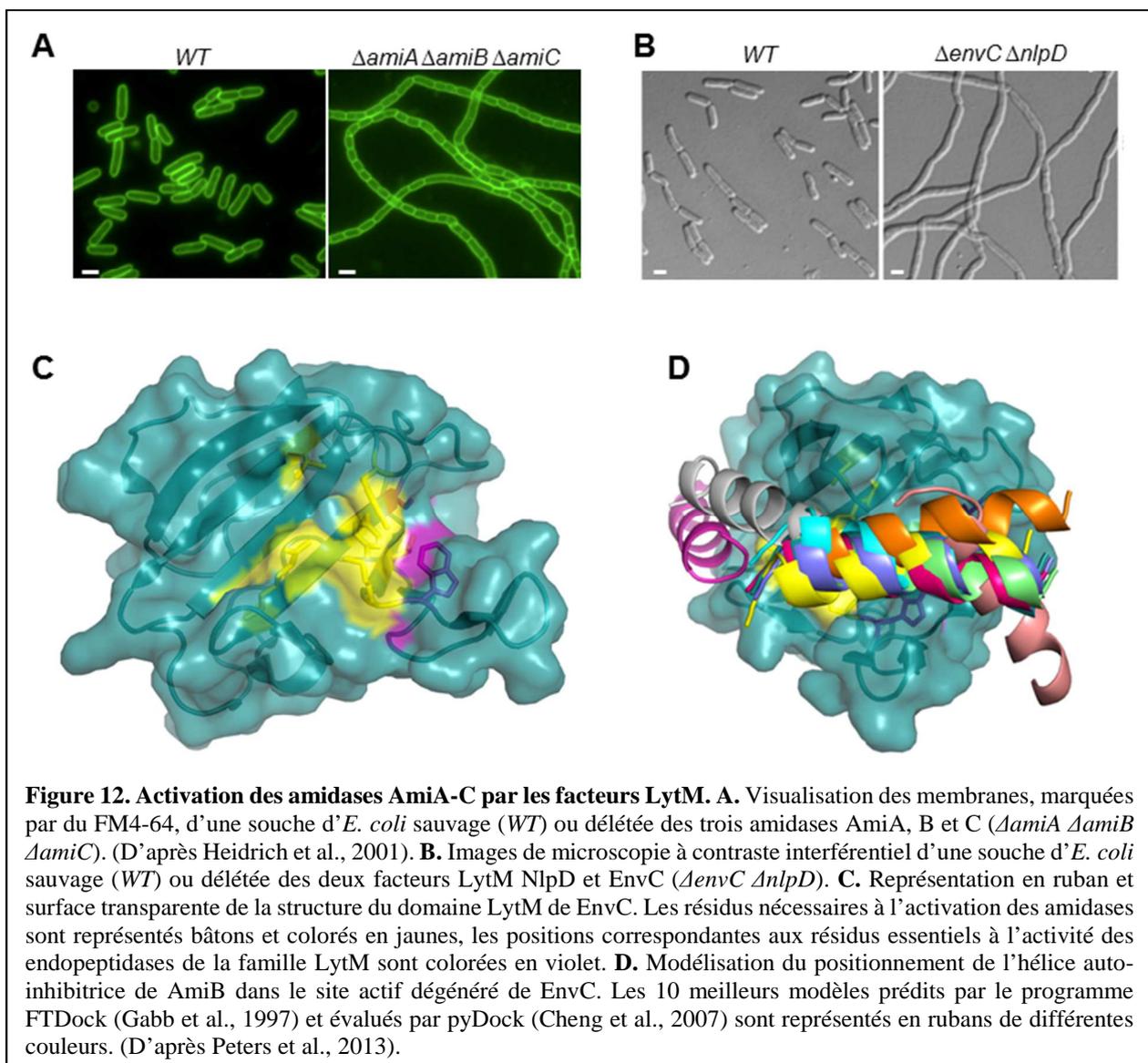
Contexte temporel et financier: travaux présents (IBS, Grenoble). Encadrement de R. Yunck pendant 6 mois au cours de sa thèse (réalisée dans le laboratoire de T. Bernhardt à la Harvard ed. School, Boston). Financement Chateaubriand (2015, coordinatrice), financement interne IBS (2016, coordinatrice).

Collaboration: internationale, équipe de T. Bernhardt (Harvard Medical School, Boston, Etats-Unis).

Après production et purification de diverses constructions recombinantes de la protéine EnvC, j'ai obtenu des cristaux du domaine LytM de EnvC et j'ai résolu sa structure cristallographique à 1.56 Å de résolution (Fig. 12C ; code PDB: 4BH5) par remplacement moléculaire. Cette structure a révélé un repliement similaire à celui de l'endopeptidase LytM de *S. aureus* mais le site actif d'EnvC est dégénéré et dépourvu de l'ion métallique catalytique présent chez LytM. Une étude de mutagenèse nous a permis d'identifier les résidus nécessaires à l'activation des amidases. Leur localisation dans et autour du site actif dégénéré montre que la poche catalytique d'EnvC a évolué à partir du site actif des métallo-endopeptidases pour contrôler l'hydrolyse de la paroi cellulaire par une autre famille enzymatique, les amidases. Des expériences de modélisation *in silico* suggèrent par ailleurs que l'hélice auto-inhibitrice d'AmiB se lierait préférentiellement dans la cavité enzymatique dégénérée d'EnvC, suggérant un modèle dans lequel l'inhibition des amidases serait levée par une interaction entre leur hélice auto-

inhibitrice et la région du site actif dégénéré des facteurs LytM (Fig. 12B). Il s'agit de la première caractérisation structurale d'un facteur LytM impliqué dans la régulation de l'hydrolyse de la paroi bactérienne et ces résultats ont fait l'objet d'une publication en co-premier et co-corresponding auteur (Peters et al., 2013).

Ce travail a fourni la première structure d'un facteur LytM. En permettant de comprendre comment une protéine descendante d'une famille d'endopeptidases a évolué pour contrôler l'activité d'une autre famille de protéine, celle des amidases de la paroi, il constitue une étape clé dans la compréhension du mécanisme moléculaire d'un système important de la régulation de la division bactérienne. Nous avons récemment obtenu des cristaux du complexe AmiB-EnvC et collecté des données de diffraction des rayons X à 2.9 Å. La résolution de la structure de ce complexe est en cours.



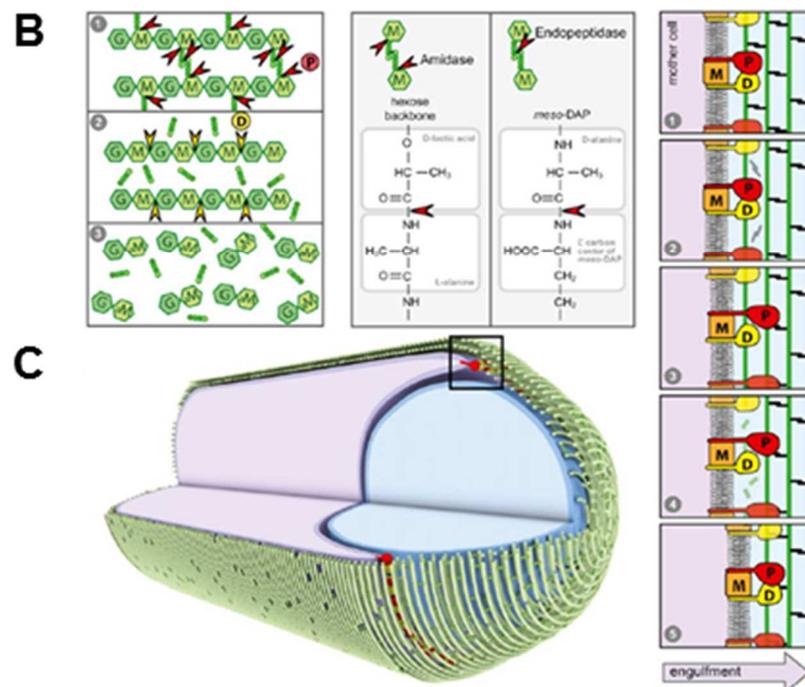
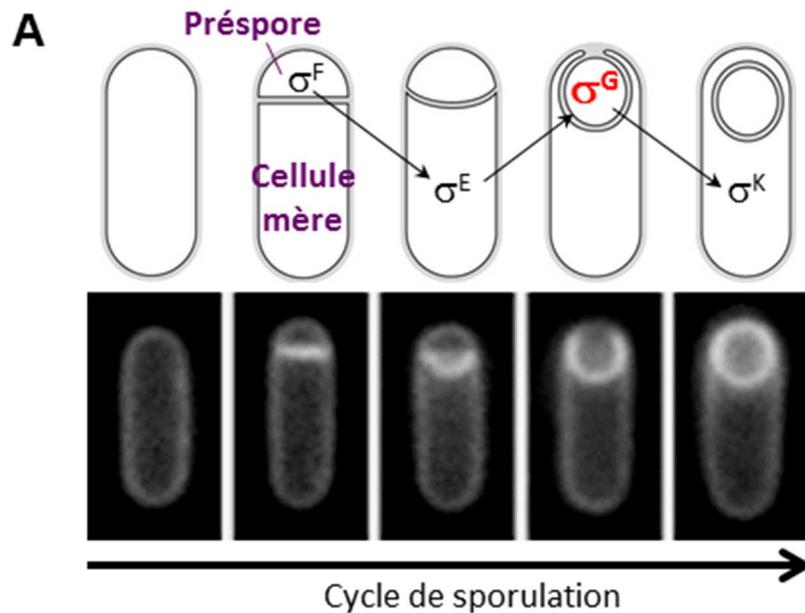
## C. Morphogénèse de la spore chez *B. subtilis*

### 1. Introduction

La sporulation bactérienne, provoquée par une carence nutritionnelle, constitue un modèle simple de différenciation morphologique qui mène à la formation d'une spore résistante à des conditions environnementales extrêmes (température, déshydratation, irradiation, agressions chimiques ou enzymatiques) (Errington, 2003; Higgins and Dworkin, 2012; Tan and Ramamurthi, 2014).

Le premier évènement du cycle de sporulation est la formation d'un septum positionné de façon asymétrique et qui divise la cellule en un grand compartiment appelé la **cellule mère** et un petit compartiment appelé la **préspore** (Fig. 13A). Deux chromosomes identiques sont distribués dans chacun des compartiments. Suite à la division asymétrique, la cellule mère et la préspore sont séparées par une **double membrane qui délimite un espace dit "intermembranaire"**, contenant initialement du PG. Peu de temps après la division polaire, des hydrolases de la paroi synthétisées dans la cellule mère vont dégrader le PG septal et faciliter la migration de la membrane de la cellule mère autour de la préspore. Ce processus est appelé l'endocytose. Après achèvement de l'endocytose, un phénomène de fission de membrane libère la préspore dans le cytoplasme de la cellule mère. À ce stade, la cellule mère achève la maturation de la préspore en l'enveloppant dans différentes couches qui vont la protéger au cours de sa dormance. Lorsque la spore est complètement mature, la cellule mère lyse et la spore est libérée dans l'environnement, où elle reste dormante jusqu'à ce que la présence de nutriments dans le milieu extérieur déclenche sa germination et le retour à la croissance végétative.

Les différentes étapes du développement de la préspore sont gouvernées par une centaine de gènes exprimés de façon séquentielle et compartimentalisée dans la cellule mère ou la préspore (Tan and Ramamurthi, 2014). L'enchaînement des différents programmes d'expression géniques est orchestré par l'activation séquentielle de quatre **facteurs de transcription sigma (Sig ou  $\sigma$ )**, spécifiques à la sporulation (Fig. 13A). Ces voies d'activation reposent sur la transduction de signaux entre la cellule-mère et la préspore, et la coordination des différents programmes d'expression géniques est assurée par le fait que la voie d'activation de chaque facteur sigma est sous le contrôle du facteur sigma précédent (Hilbert and Piggot, 2004). Dans les stades précoces de la sporulation, la transcription sous contrôle de  $\sigma_F$  dans la préspore est nécessaire pour activer le facteur de transcription  $\sigma_E$  dans la cellule mère. Au cours des stades tardifs, le facteur de transcription  $\sigma_G$  dans la préspore est nécessaire pour activer l'expression des gènes de la cellule mère sous contrôle de  $\sigma_K$ .



**Figure 13. A. Le cycle de sporulation chez *B. subtilis*.** Les différentes étapes du développement de la présore sont visualisées par microscopie en fluorescence et schématisées de façon à montrer l'activation séquentielle et compartimentalisée des facteurs sigma ( $\sigma$ ). **B. La coordination des activités d'hydrolyse du PG au sein du complexe d'endocytose permet la migration de la membrane de la cellule mère autour de la présore.** Les panneaux de gauche montrent les activités séquentielles et complémentaires de SpoIIP (P) et SpoIID (D): (1) SpoIIP clive les liaisons amides entre les sucres et la chaîne peptidique, et entre deux peptides réticulés ; (2) SpoIID clive la chaîne de sucre dénudée en unités disaccharidiques (3). Sur les panneaux centraux sont représentées les liaisons amides clivées par SpoIIP. Sur les panneaux de droite est représenté le modèle du cycle catalytique réalisé par le complexe SpoIIP-SpoIID-SpoIIM (M): (1) SpoIIP et SpoIID en complexe avec SpoIIM se lieut au PG ; (2) SpoIID stimule l'activité de SpoIIP qui dénude la chaîne de sucre de ses chaînes peptidiques ; (3) SpoIIP se réassocie à une chaîne de PG voisine ; (4) SpoIID dégrade la chaîne de sucre dénudée en unités disaccharidiques et se réassocie à SpoIIP (5). **C.** Représentation d'une cellule de *B. subtilis* au cours du processus d'endocytose. Dans ce schéma, le complexe SpoIIP-SpoIID-SpoIIM entraîne la migration de la membrane de la cellule mère (en violet) vers le pôle extérieur de la présore (en bleu). (D'après Morlot et al., 2010).

## 2. Travaux réalisés

### a. Etude fonctionnelle d'un complexe d'hydrolases impliqué dans la morphogénèse de la spore

Contexte temporel et financier: travaux post-doctoraux (Harvard Med. School, Boston).

Au cours de mon second stage post-doctoral, je me suis intéressée à un complexe composé de trois protéines membranaires essentielles au processus d'endocytose : **SpoIIM**, **SpoIIP** et **SpoIID** (Chastanet and Losick, 2007). Ces protéines sont requises pour la dégradation du PG septal présent entre les membranes de la cellule mère et de la présore. Des mutants de SpoIID et SpoIIP induisent des défauts de migration de la membrane de la cellule mère autour de la présore, suggérant que ce complexe a non seulement un rôle dans l'hydrolyse du PG mais également une fonction dans la migration des membranes (Mello et al., 2002). Avant le début de ce projet, une activité d'hydrolyse de la paroi avait été mise en évidence pour SpoIIP et SpoIID, mais la nature de ces activités restait indéterminée (Chastanet and Losick, 2007; Mello et al., 2002). SpoIIP présente une faible identité de séquence avec la famille des amidases de type LytC (Pfam\_amidase3) qui coupent les liaisons amides entre les chaînes de sucres et les peptides du PG. SpoIID quant à elle, partage des similarités de séquence avec la protéine LytB de *B. subtilis* qui stimule l'activité de LytC (Herbold and Glaser, 1975), ce qui suggérait que SpoIID puisse elle-aussi stimuler l'activité de SpoIIP.

SpoIIM, SpoIIP et SpoIID sont synthétisées dans la cellule mère après la fermeture du septum asymétrique et se localisent en son centre où est initiée la dégradation du PG (Aung et al., 2007; Chastanet and Losick, 2007; Mello et al., 2002). Les protéines se localisent ensuite sur le front membranaire qui endocytose la présore. Il avait déjà été proposé que la dégradation du PG réalisée par ce complexe permette la migration de la membrane de la cellule mère autour de la présore mais ce mécanisme restait encore non élucidé (Mello et al., 2002). Ce projet a donc consisté à déterminer l'activité hydrolytique des protéines SpoIIP et SpoIID, à mettre en évidence et caractériser leurs interactions enzymatiques. De par sa faible identité de séquence avec les amidases de type LytC, SpoIIP représente un nouveau sous-groupe dans cette famille protéique. En réalisant des tests d'activité d'hydrolyse du PG en solution couplés à l'analyse des produits de digestion par chromatographie d'affinité et spectrométrie de masse, j'ai montré que SpoIIP est effectivement une amidase qui clive les liaisons entre les sucres et les peptides (Fig. 13B) (Morlot et al., 2010). De façon plus surprenante, j'ai également montré qu'elle est capable de cliver les liaisons amides qui réticulent les chaînes de peptides voisines (Fig. 13B), une activité que l'on pensait être spécifique aux D,D-endopeptidases. Ces deux activités requièrent la même histidine catalytique, suggérant qu'elles sont réalisées au sein du même site actif, et elles sont toutes deux stimulées par la présence physique de SpoIID.

Des tests d'activité similaires m'ont permis de montrer que SpoIID est une transglycosylase lytique qui dégrade les chaînes de sucre en unités disaccharidiques (Fig. 13B) (Morlot et al., 2010). J'ai également découvert que SpoIID ne peut cliver que des chaînes glycanes "nues", dépourvues de chaînes

peptidiques. Puisque SpoIID ne présente aucune identité de séquence avec les hydrolases du PG connues, elle définit donc une nouvelle famille de transglycosylases lytiques. Une conséquence du fait que SpoIID ne soit active que sur des chaînes de sucre nues est qu'aucun mucopeptide (des disaccharides liés à des chaînes peptidiques) n'est généré au cours du processus d'endocytose (Fig. 13B). Cela constitue un fait important puisque les mucopeptides peuvent initier le processus de germination des spores (Shah et al., 2008). Les activités séquentielles de SpoIIP et SpoIID permettraient donc d'éviter une germination prématurée et inappropriée.

Nos résultats suggèrent que les activités coordonnées de SpoIIP et SpoIID constituent un cycle catalytique générant la force motrice nécessaire au processus d'endocytose. Ce modèle impliquerait les étapes suivantes: (1) SpoIIP et SpoIID (en complexe avec SpoIIM) se lieraient au PG ; (2) SpoIID stimulerait le clivage des peptides par SpoIIP ; (3) SpoIIP se détacherait du PG et se réassocierait au prochain ligand alors que SpoIID resterait liée à la chaîne de sucre dénudée ; (4) la libération de SpoIIP exposerait la chaîne de sucre dénudée qui serait alors clivée par SpoIID ; (5) SpoIID à son tour serait libérée et se réassocierait à SpoIIP (Fig. 13B). Ainsi, durant toute la durée de ce processus catalytique, au moins un des membres du complexe d'endocytose serait lié au PG, permettant une dégradation processive de ce dernier. La répétition de ce cycle par ces complexes membranaires distribués de façon circumférentielle (Fig. 13C) permettrait de faire migrer progressivement la membrane de la cellule mère autour de la préspore (Morlot et al., 2010).

## **b. Etude fonctionnelle du complexe SpoIIIA-SpoIIQ impliqué dans la morphogénèse de la spore**

Contexte temporel et financier: travaux post-doctoraux (Harvard Med. School, Boston).

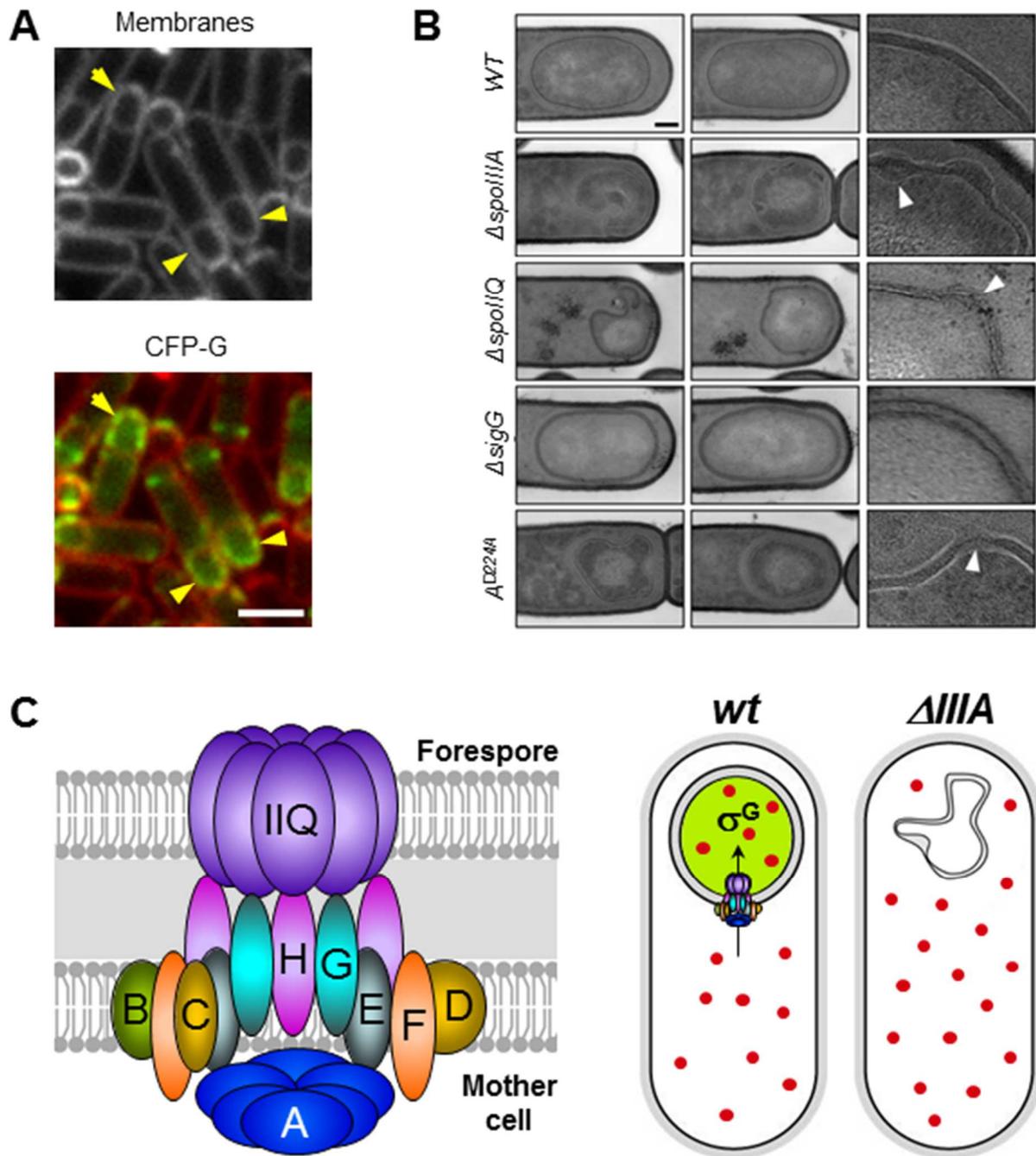
Les voies d'activation des différents facteurs sigma ont été extrêmement bien décrites, sauf une, celle de  $\sigma_G$ , qui contrôle dans la préspore l'expression de gènes impliqués dans la résistance aux ultraviolets, le stockage d'acides aminés et l'activation de  $\sigma_K$ . Les raisons pour lesquelles le mécanisme d'activation de  $\sigma_G$  n'est toujours pas résolu sont à attribuer à la double régulation à laquelle est soumis ce facteur de transcription.  $\sigma_G$  est d'abord régulé de façon transcriptionnelle par un mécanisme encore inconnu. Une fois  $\sigma_G$  synthétisé, son activité requiert la présence de huit protéines **SpoIIIA** (**SpoIIIAA**, **SpoIIIAB**, **SpoIIIAC**, **SpoIIIAD**, **SpoIIIAE**, **SpoIIIAF**, **SpoIIIAG** et **SpoIIIAH**) codées par l'opéron *spoIIIA* et exprimées dans la cellule mère, et de la protéine membranaire **SpoIIQ** exprimée dans la préspore (Kellner et al., 1996; Londoño-Vallejo et al., 1997). L'activité de  $\sigma_G$  requiert par ailleurs le bon déroulement du processus d'endocytose (Frandsen and Stragier, 1995). Lorsque toutes ces conditions sont réunies,  $\sigma_G$  reconnaît son propre promoteur et son niveau de transcription dans la préspore augmente rapidement (Hilbert and Piggot, 2004). Le modèle couramment proposé était que les protéines SpoIIIA sont impliquées dans la surveillance du processus d'endocytose et dans la transduction d'un signal, envoyé par la cellule mère à la préspore pour activer  $\sigma_G$  une fois l'endocytose

achevée (Rudner and Losick, 2001). Au cours de mon stage post-doctoral, mon projet a consisté à investiguer ce modèle et mes résultats suggèrent un modèle relativement différent.

L'une des étapes clés du cycle de développement de la spore repose sur l'assemblage d'un complexe membranaire hétéro-multimérique, le **complexe SpoIIIA-SpoIIQ**, qui traverse les membranes de la cellule mère et de la préspore et est nécessaire à l'activation du facteur de transcription  $\sigma_G$  dans la préspore. Le complexe SpoIIIA-SpoIIQ comprend au moins 9 protéines différentes (SpoIIIAA-AH et SpoIIQ). La fonction de ce complexe reste énigmatique mais la ressemblance des protéines qui le composent avec certains composants des flagelles et des **systèmes de sécrétion spécialisés de type II, III ou IV (T2SS, T3SS et T4SS)**, suggère un rôle de sécrétion ou de transport passif d'un composant de nature inconnue de la cellule mère vers la préspore.

Lorsque j'ai débuté ce projet, en étroite collaboration avec Thierry Doan, un autre post-doctorant du laboratoire, il avait été montré que les protéines SpoIIIAH et SpoIIQ sont localisées dans les membranes qui entourent la préspore, qu'elles interagissent à travers cette double membrane et que plusieurs des protéines SpoIIIA présentent des similarités avec certains composants des flagelles et des T2SS, T3SS ou T4SS (Doan et al., 2005; Camp and Losick, 2008; Meisner et al., 2008). En effet, SpoIIIAA ressemble à des ATPases trouvées dans les T4SS, alors que SpoIIIAB et SpoIIIAE possèdent des domaines présentant de faibles identités de séquence avec GspF qui attache l'ATPase au complexe membranaire dans les T2SS. Enfin, SpoIIIAF, SpoIIIAG et SpoIIIAH montrent de faibles identités de séquence avec la famille des protéines EscJ/PrgK qui forment des anneaux dans les T3SS. Nous avons donc cherché à déterminer si les protéines SpoIIIA et SpoIIQ pouvait former un complexe de sécrétion. Nous avons d'abord montré par mutagenèse dirigée que les motifs ATPase de SpoIIIAA sont nécessaires à l'activité de  $\sigma_G$  et au développement d'une spore fonctionnelle. Ces mêmes motifs ATPase sont trouvés dans des composants des T4SS. Nous avons ensuite réalisé des expériences d'immunoprecipitation qui ont mis en évidence l'existence d'un complexe membranaire composé d'au moins six des protéines SpoIIIA (SpoIIIAB, SpoIIIAD, SpoIIIAE, SpoIIIAF, SpoIIIAG, SpoIIIAH) dans la cellule mère et de la protéine SpoIIQ dans la préspore. Nous avons également montré par microscopie en fluorescence conventionnelle que ce complexe est localisé dans les membranes qui entourent la préspore (Fig. 14A) (Doan et al., 2009).

En observant par microscopie en fluorescence et électronique des souches mutantes pour les gènes *spoIIIA* et *spoIIQ*, nous avons par ailleurs observé un phénotype nouveau qui suggère que les protéines SpoIIQ, SpoIIIA et les motifs ATPase de SpoIIIAA sont nécessaires au maintien de l'intégrité de la préspore. En effet, en l'absence de ces protéines, la préspore présente de larges invaginations membranaires et semble "effondrée" sur elle-même (Fig. 14B) (Doan et al., 2009). Ce phénotype n'est pas dû à l'absence d'activité de  $\sigma_G$  et il disparaît lorsque de très faibles niveaux de protéines SpoIIIA sont exprimés dans la cellule mère. Ces faibles niveaux de protéine restaurent par ailleurs une efficacité de sporulation équivalente à la souche sauvage.



**Figure 14. Etude fonctionnelle du complexe SpoIIIA-SpoIIQ.** **A.** La protéine de fusion CFP-SpoIIIA-G (CFP-G) montre une localisation sous forme de points autour de la présore. Les cellules de *B. subtilis* ont été observées 2h après l'entrée en sporulation et les membranes ont été marquées par le fluorophore TMA-DPH. La barre d'échelle représente 2  $\mu$ m. **B.** Morphologies de présore observées en microscopie électronique 3h après l'entrée en sporulation de cellules de type sauvage (WT), délétées de l'opéron *spoIIA* ( $\Delta spoIIA$ ), des gènes *spoIIQ* ( $\Delta spoIIQ$ ) ou *sigG* ( $\Delta sigG$ ), ou exprimant la protéine SpoIIIAA mutée au niveau du motif ATPase ( $A^{D224A}$ ). Les panneaux de droite montrent un agrandissement des aberrations membranaires et les flèches indiquent la présence de renflements ou d'interruptions de membranes. **C.** Modèle du complexe SpoIIIA-SpoIIQ formant un "tube nourricier" qui sécrète un métabolite ou un osmolyte nécessaire au maintien de l'intégrité de la présore et à l'activité de  $\sigma G$ . Le schéma de gauche est une représentation du complexe de sécrétion SpoIIIA-SpoIIQ ancré dans les deux membranes qui entourent la présore. Les deux panneaux de droite représentent le modèle du "tube nourricier", avec perte de l'intégrité de la présore et de l'activité de  $\sigma G$  en absence des protéines SpoIIIA ou SpoIIQ. (D'après Doan et al., 2009).

Ces observations suggèrent donc que le complexe SpoIIIA-SpoIIQ aurait un rôle enzymatique direct dans le maintien de l'intégrité de la préspore et que cette dernière serait nécessaire et suffisante à l'activité de  $\sigma$ G. Nous avons validé cette hypothèse en montrant qu'au cours des premières étapes de la sporulation, lorsque la physiologie de la préspore est intègre, l'activité de  $\sigma$ G est indépendante de SpoIIIA et de SpoIIQ. Nous avons également montré que l'activité de  $\sigma$ G est indépendante du processus d'endocytose et conclu qu'elle dépendrait donc uniquement de l'état physiologique de la spore, maintenu par les protéines SpoIIIA et SpoIIQ au cours des dernières étapes de la sporulation.

En parallèle à ce travail, d'autres groupes ont publié des expériences qui suggèrent que SpoIIQ forme un pore dans la membrane interne de la préspore et que le complexe minimal SpoIIIAH-SpoIIQ serait impliqué dans le transport d'une molécule encore inconnue, nécessaire à l'activité de  $\sigma$ G (Camp and Losick, 2008, 2009; Meisner et al., 2008). Ces données, combinées à nos résultats, supportent donc un modèle dans lequel le complexe SpoIIIA-SpoIIQ formerait un système de sécrétion ou un canal ancré dans les deux membranes qui entourent la préspore, et qui transporterait un nutriment ou un osmolyte nécessaire au maintien du potentiel physiologique et à l'activité de  $\sigma$ G (Fig. 14C). Nos résultats ont remis en cause le modèle original d'activation de  $\sigma$ G en montrant que la régulation de  $\sigma$ G repose uniquement sur un retard de transcription du gène *sigG* et sur la maintenance du potentiel métabolique de la préspore par le complexe SpoIIIA-SpoIIQ. Ce complexe qui jouerait le rôle d'un cordon ombilical, permettant à la cellule mère de nourrir la préspore au cours des dernières étapes de son développement en transportant un osmolyte ou une petite protéine nécessaire au maintien du potentiel physiologique de la préspore. Il constituerait le seul système « nutritif » entre cellules bactériennes connu à ce jour. Ce travail a fait l'objet d'un article sur lequel je partage une position de co-premier auteur avec mon collègue Thierry Doan (Doan et al., 2009).

### **c. Etude structurale du complexe SpoIIIA-SpoIIQ impliqué dans la morphogenèse de la spore**

Contexte temporel et financier: travaux présents, encadrement de X. Henry (post-doc).

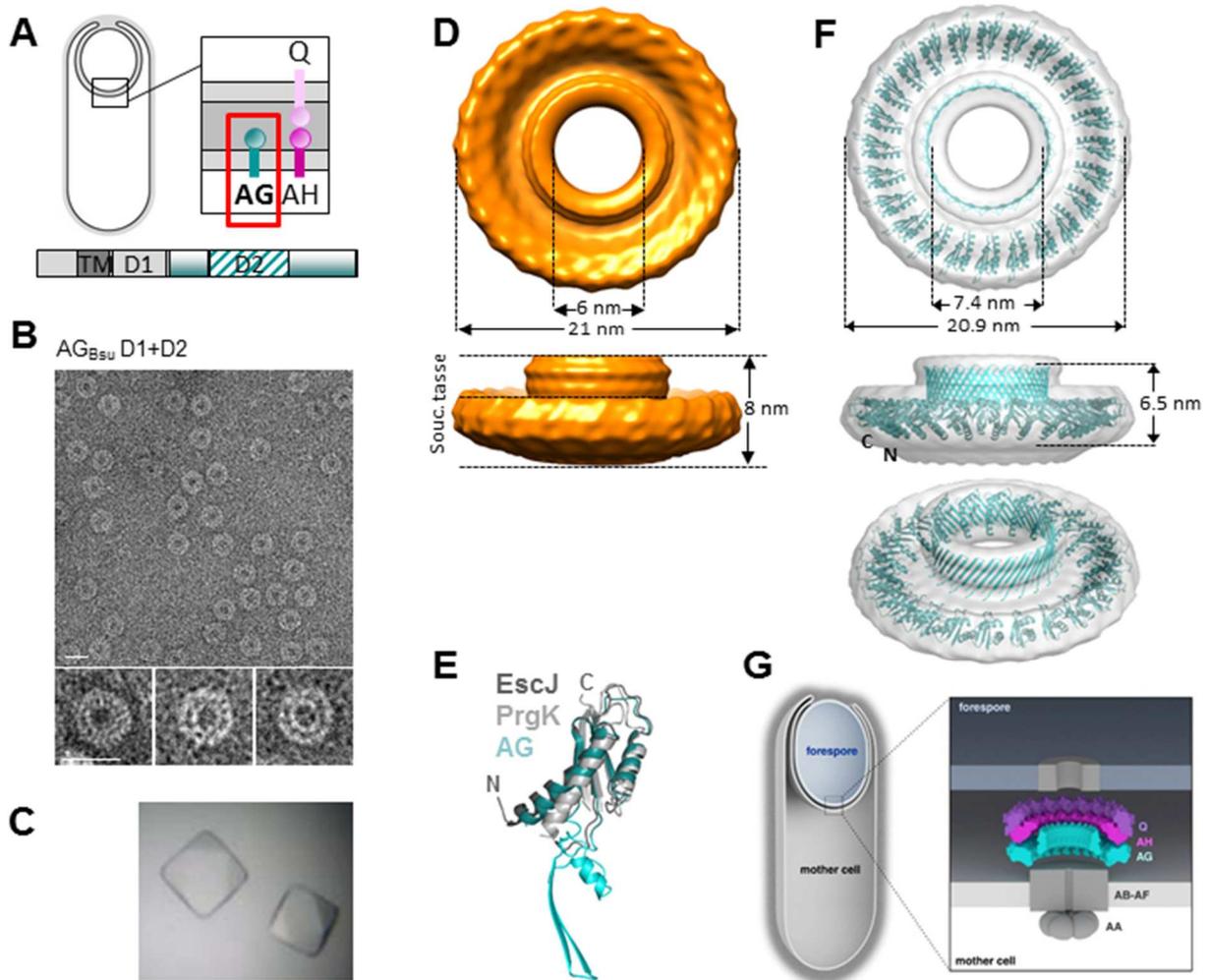
Collaboration: internationale, équipe de D. Rudner (Harvard Medical School, Boston, Etats-Unis).

Suite à ce travail post-doctoral et à mon recrutement au CNRS, je me suis engagée en 2012 dans une collaboration avec le groupe de D. Rudner pour réaliser l'étude structurale du complexe SpoIIIA-SpoIIQ. Ce projet a pour but de déterminer les mécanismes moléculaire de l'assemblage de ce complexe et identifier les similitudes structurales avec les systèmes de sécrétion spécialisés afin de mieux comprendre sa fonction. En 2012, deux groupes indépendants ont résolu la structure cristallographique du complexe dimérique SpoIIIAH-SpoIIQ, proposant un modèle dans lequel ces deux protéines formeraient des anneaux similaires à ceux trouvés dans les T3SS (Levdikov et al., 2012; Meisner et al., 2012). Ce modèle reste toutefois à tester expérimentalement.

J'ai produit sous forme recombinante chez *E. coli* et purifié les domaines solubles des protéines

SpoIIIAA, AB, AF et AG. **SpoIIIAAG** a donné des résultats très stimulants. SpoIIIAAG est composée d'un segment transmembranaire N-terminal, d'une région soluble faiblement conservée et peu structurée (domaine D1) et d'une région structurée de plus forte conservation (domaine D2) présentant une faible identité de séquence (~20%) avec la famille de protéines **EscJ/PrgK qui forment des anneaux dans les T3SS** (Fig. 15A). Nous avons montré en combinant des techniques de biophysique (ultracentrifugation analytique) et de microscopie électronique qu'une construction recombinante contenant les domaines D1 et D2 forme de larges anneaux contenant au moins 24 protomères (Fig. 15B). J'ai cristallisé ces anneaux (Fig. 15C) mais malgré des efforts intenses (cristallisation de protéines orthologues, obtention de différentes formes cristallines, tests de diverses techniques de collectes de données), leur diffraction des rayons X s'est toujours limitée à 8 Å. Nous avons donc résolu la structure des anneaux formés par les domaines D1+D2 à 38 Å par cryo-microscopie électronique, ce qui a révélé une architecture en forme de "tasse-et-soucoupe" avec des diamètres interne et externe de 6 et 21 nm (Fig. 15D) (Rodrigues et al., 2016a).

Le degré d'oligomérisation de SpoIIIAAG et les dimensions de la région en forme de "soucoupe" sont similaires à ceux des anneaux de EscJ/PrgK dans les T3SS (Schraidt and Marlovits, 2011; Suzuki et al., 2004; Yip et al., 2005). La région en forme de "tasse" rappelle quant à elle la région centrale formée par l'anneau de FliF dans les flagelles (Suzuki et al., 2004). La modélisation *in silico* de SpoIIIAAG sur la base de la structure d'EscJ/PrgK a généré un modèle composé d'une région similaire aux domaines d'oligomérisation (**RBM** ou "**Ring Building Motif**") présents chez EscJ/PrgK et d'une région comprenant deux longs brins  $\beta$  (Fig. 15E). Le modèle du protomère de SpoIIIAAG a été placé dans la carte de densité électronique et une symétrie rotationnelle de 24 a permis de générer un modèle de l'anneau formé par SpoIIIAAG (Fig. 15F). Dans ce modèle, la région en forme de "soucoupe" serait formée par la région RBM de SpoIIIAAG tandis que la région en forme de "tasse" serait constituée d'un tonneau  $\beta$  formé par l'oligomérisation du long feuillet  $\beta$  présent dans la région centrale de SpoIIIAAG. La mutation de résidus localisés au niveau de l'interface d'oligomérisation a déstabilisé la formation des anneaux de SpoIIIAAG *in vitro* et altéré l'activation de  $\sigma_G$  et l'efficacité de sporulation *in vivo*. L'ensemble de nos données montrent que les anneaux formés par SpoIIIAAG sont importants pour l'assemblage et/ou la fonction du complexe SpoIIIA-SpoIIQ (maintien de la physiologie de la spore, activité de  $\sigma_G$  et développement de la spore). SpoIIIAH, localisée dans la membrane externe de la préspore, possède elle-aussi un domaine RBM et interagit directement avec SpoIIQ, ancrée dans la membrane interne de la préspore. Par analogie avec l'empilement d'anneaux observé chez les systèmes de sécrétion de type III, nous avons proposé un modèle dans lequel l'anneau de SpoIIIAAG serait accolé à un anneau putatif de SpoIIAH, lui-même accolé à un anneau putatif de SpoIIQ (Fig. 15G). Ces trois anneaux, en interaction avec les autres protéines SpoIIIA, connecteraient les deux compartiments cytoplasmiques et permettraient le transport d'une molécule inconnue de la cellule mère vers la préspore.



**Figure 15. La protéine SpoIIIAG s'assemble en une structure annulaire permettant le passage d'un métabolite, osmolyte ou petite protéine nécessaire au maintien de l'intégrité de la préspore et à l'activité de  $\sigma_G$ .** **A.** Schéma représentant la topologie des protéines SpoIIIAG (AG), SpoIIIAH (AH) et SpoIIQ (Q) ancrées dans les deux membranes qui entourent la préspore. L'organisation en domaines de SpoIIIAG est montrée sur le schéma du bas. Dans le domaine D2, les régions de SpoIIIAG homologues à EscJ/PrgK sont colorées en cyan unis, la région d'insertion est hachurée. **B.** Anneaux formés par SpoIIIAG observés en microscopie électronique (coloration négative). Les barres d'échelle représentent 20 nm. **C.** Cristaux formés par les anneaux de SpoIIIAG. **D.** Reconstruction 3D en cryo-microscopie électronique de la structure des anneaux de SpoIIIAG, montrant une architecture en "tasse et soucoupe" (souc.). Les dimensions de l'anneau sont indiquées. **E.** Modèle in silico de SpoIIIAG superposé aux domaines RBM de EscJ (code PDB 1YJ7, en gris foncé) et PrgK (code PDB 3J6D, en gris clair). Les régions de SpoIIIAG homologues à EscJ/PrgK sont colorées en cyan foncé, la région d'insertion en cyan clair. **F.** Modèle in silico de l'anneau de SpoIIIAG placé dans la carte de densité de microscopie électronique. Les dimensions du modèle, ainsi que les extrémités N- et C-terminales de l'un des protomères de SpoIIIAG sont indiquées. **G.** Modèle d'assemblage du complexe SpoIIIA-SpoIIQ dans les deux membranes qui entourent la préspore. SpoIIIAH (AH) et SpoIIQ (Q) sont montrées sous la forme de deux anneaux contenant 18 protomères de chaque protéine comme proposé par Meisner et al., 2012. L'anneau formé par SpoIIIAG est coloré en cyan. Les autres protéines membranaires codées par l'opéron *spoIIIA* (SpoIIIAB-AF) sont montrées de façon schématique sous la forme d'un complexe formant un pore dans la membrane de la cellule mère. L'ATPase SpoIIIAA (AA) est montrée comme un hexamère par analogie avec les autres ATPases de sécrétion. Un pore est également représenté dans la membrane de la préspore bien que l'identité de la protéine qui le forme reste à découvrir. (D'après Rodrigues et al., 2016a).



# **PROJET DE RECHERCHE**



## I - Préambule

L'un des plus grand défis aujourd'hui dans le domaine de la morphogénèse et de la division bactérienne est de comprendre comment les protéines en charge de ces processus (les protéines morphogénétiques) s'assemblent dans la cellule pour former des machineries fonctionnelles. En d'autres termes, il faut déterminer comment ces grands assemblages protéiques sont structurés et échafaudés, et déterminer leur comportement dynamique dans le temps et dans l'espace. Il est nécessaire pour cela de combiner des études *in vitro* visant à étudier les interactions moléculaires que ces machineries protéiques abritent (caractérisation biochimique et structurale) et des études *in vivo* visant à déterminer la dynamique (comportement spatial et temporel) de ces machineries dans la cellule. Les compétences que j'ai acquises depuis mon doctorat en biologie moléculaire, en biochimie, en biologie structurale et en imagerie cellulaire me permettent aujourd'hui de superviser des projets faisant appel à des techniques qui génèrent ces données structurales et cellulaires. C'est cette approche de biologie structurale et cellulaire intégrée que je souhaite continuer à utiliser pour poursuivre l'étude de processus liés à la morphogénèse et/ou la division bactérienne.

Depuis mon recrutement au CNRS, je me suis engagée dans de nombreux projets. Un certain nombre d'entre eux se sont achevés ou s'achèveront sous peu (projet amidase-activateur, projet MurT-GatD, projet Pmp23) après publication. Dans le futur, je souhaite me concentrer sur deux projets principaux : la compréhension du mécanisme d'assemblage et de l'architecture de la machinerie de division chez *S. pneumoniae*, qui constitue une source riche de cibles antibactériennes, et la compréhension du mécanisme d'assemblage et de l'architecture de la machinerie SpoIIIA-SpoIIQ impliquée dans la morphogénèse de la spore chez *B. subtilis*, car je suis fascinée par ce grand assemblage moléculaire dont on ne connaît ni l'architecture ni la fonction.

## II - Développement thématique du projet de recherche

### A. Morphogénèse et division chez *S. pneumoniae*

Aujourd'hui, l'identité de la plupart des protéines de la division et de la morphogénèse bactérienne est connue, l'activité enzymatique et la structure tridimensionnelle de nombreuses d'entre elles sont disponibles, et de nombreux couples de partenaires protéiques ont été identifiés par des approches génétiques ou biochimiques. Toutefois, nous ne parvenons toujours pas à comprendre **comment ces protéines s'assemblent dans la cellule pour former des machineries fonctionnelles en charge de la division et de la morphogénèse bactérienne**. Cet aspect-là du vivant ne peut être élucidé qu'avec une **approche structurale et cellulaire intégrée**, c'est-à-dire une stratégie intégrant l'étude des machineries protéiques au niveau moléculaire et cellulaire. C'est cette stratégie que j'appliquerai pour étudier les mécanismes d'assemblage de la machinerie de division et de synthèse de la paroi chez *S. pneumoniae*

(Fig. 16). Un financement ANR (projet de recherche collaborative DIVinHD, 357 714 €) a été alloué pour la période 2016-2021. Je suis la coordinatrice de ce projet, mené en collaboration avec l'équipe Pixel (dirigé par D. Bourgeois) de l'IBS et le groupe de C. Grangeasse au MMSB (Molecular Microbiology and Structural Biochemistry, UMR 5086) à Lyon. Le projet DIVinHD est fondé sur notre récente mise au point du PALM 1-couleur chez *S. pneumoniae*. Ce développement a généré des données fondamentales sur la structure physiologique formée par la protéine du cytosquelette FtsZ (l'anneau Z) qui échafaude l'assemblage du divisome (Fig. 8) (Jacq et al., 2015). DIVinHD a pour objectif d'exploiter cette avancée récente et propose une approche pluridisciplinaire combinant génétique, biochimie, imagerie super-résolue et biologie structurale pour comprendre comment des protéines clés de la division et du remodelage du PG s'assemblent sur l'anneau Z, et comment cet assemblage est régulé par la phosphorylation médiée par la Ser/Thr kinase StkP. Il inclut le projet de thèse de C. Arthaud (Etude biochimique et cellulaire du couple FtsZ-EzrA), que je co-encadre depuis Octobre 2015 avec T. Vernet, ainsi qu'un post-doctorant qui sera financé pendant 3 ans par l'ANR. DIVinHD est à l'image de mon projet de recherche à long terme sur la division et la morphogénèse du pneumocoque, qui est de comprendre les mécanismes d'assemblage de la machinerie de division et de synthèse de la paroi.

Je souhaite en particulier répondre aux questions développées dans les paragraphes suivants.

### **1. Quels sont les partenaires de FtsZ qui régulent l'architecture granuleuse hétérogène (formation d'amas protéiques) de l'anneau Z ?**

Cette question sera abordée à travers l'étude en PALM 1-couleur de la nanostructure de l'anneau Z dans des souches mutantes (délétion ou déplétion) pour les partenaires de FtsZ (FtsA, ZapA, SepF, EzrA, MapZ, StkP).

Parmi ces partenaires, FtsA, un homologue de l'actine eucaryote, est une protéine cytoplasmique qui polymérise sous la forme de longs filaments *in vitro* (Szwedziak et al., 2012). Elle possède une hélice C-terminale amphiphile et elle ancre FtsZ à la membrane plasmique en interagissant directement avec son extrémité C-terminale (Ortiz et al., 2016; Szwedziak et al., 2012, 2014), sa déplétion va donc très certainement entraîner une modification de l'architecture de l'anneau Z *in vivo*. Toutefois, il n'est pas certain que son absence entraîne une modification de l'organisation des molécules de FtsZ en amas.

ZapA est une protéine cytoplasmique qui promeut l'association latérale des filaments de FtsZ *in vitro* (Ortiz et al., 2016; Gueiros-Filho and Losick, 2002; Low et al., 2004). Un rôle a déjà été identifié pour ZapA dans l'architecture de l'anneau Z chez *E. coli*: en absence de ZapA, les amas de FtsZ contiennent moins de molécules, sont moins volumineux, moins denses et une grande partie d'entre eux ne sont plus positionnés au site de division (Buss et al., 2013). L'effet de l'absence de ZapA sur l'architecture de l'anneau Z chez le pneumocoque sera donc analysé en PALM pour déterminer si le rôle de ZapA est conservé chez les coques à Gram positif.

SepF (gène *ylmF*) est une protéine cytoplasmique possédant une hélice N-terminale amphiphile et elle interagit directement avec l'extrémité C-terminale de FtsZ (Ortiz et al., 2016; Singh et al., 2008). *In vitro*, elle polymérise sous la forme d'une structure annulaire capable de capturer des filaments de FtsZ (Gündoğdu et al., 2011). Sa délétion chez le pneumocoque provoque la formation de cellules allongées présentant de nombreux septa avortés (Fadda et al., 2003).

EzrA est une protéine cytoplasmique ancrée à la membrane plasmique via une hélice transmembranaire N-terminale. Elle interagit directement avec l'extrémité C-terminale de FtsZ mais la région d'interaction chez EzrA reste controversée (Cleverley et al., 2014; Singh et al., 2007). *In vitro*, EzrA inhibe la polymérisation de FtsZ mais n'a aucun effet sur la dépolymérisation de filaments de FtsZ pré-formés (Chung et al., 2007; Haeusser et al., 2004). Par ailleurs, EzrA semble déstabiliser les interactions latérales entre les filaments de FtsZ, limitant la formation de faisceaux de filaments (Chung et al., 2007; Singh et al., 2007). EzrA est essentielle chez *S. pneumoniae* (van Opijnen et al., 2009). En revanche, elle est non-essentielle chez *B. subtilis* ; son absence provoque la formation d'anneaux surnuméraires dans des régions autres que le milieu de la cellule et sa surexpression bloque la formation d'anneaux Z, suggérant que les deux fonctions d'EzrA (inhibition de la polymérisation de FtsZ et déstabilisation des faisceaux de filaments) régulent l'assemblage de l'anneau Z au site de division (Haeusser et al., 2004; Levin et al., 1999). La résolution de la structure cristallographique d'EzrA a par ailleurs montré que la protéine adopte un repliement en forme de demi-cercle, dont le diamètre serait suffisamment large pour accommoder un filament de FtsZ, voire même un filament de FtsZ associé à un filament de FtsA (Cleverley et al., 2014). Cette structure a suggéré un modèle dans lequel l'association d'EzrA à FtsZ limiterait les interactions entre les filaments de FtsZ et constituerait un moyen supplémentaire d'ancrer l'anneau Z à la membrane (Voir Fig. 3E p. 36). Il a par ailleurs été montré qu'EzrA connecte l'anneau Z à la machinerie de synthèse de la paroi via la protéine cytoplasmique GpsB chez *S. aureus*, *B. subtilis* et *S. pneumoniae* (Claessen et al., 2008; Fleurie et al., 2014b; Steele et al., 2011). Le rôle d'EzrA dans la division semble donc multiple et s'étendrait de l'assemblage de l'anneau Z à la celui de la machinerie de synthèse de la paroi. L'étude de cette protéine est donc essentielle à la compréhension de l'assemblage de la machinerie de la division bactérienne.

MapZ (LocZ) est une protéine bitopique possédant un domaine extracellulaire (C-terminal) de liaison au PG et un domaine intracellulaire (N-terminal) dont l'hélice N-terminale interagit directement avec le domaine globulaire de FtsZ (et non avec son extrémité C-terminale, contrairement à tous les autres partenaires de FtsZ) (Fleurie et al., 2014a; Grangeasse and Lesterlin, 2015; Holečková et al., 2015; Manuse et al., 2016a). MapZ guide la localisation et l'orientation de l'anneau Z au site de division (Voir p. 37 et Fig. 3B p. 36). Le domaine cytoplasmique de MapZ est phosphorylé par la Ser/Thr kinase StkP qui est un régulateur majeur de la division chez *S. pneumoniae* (Fleurie et al., 2012, 2014a).

MapZ étant un substrat de StkP et FtsZ étant elle-même phosphorylée par StkP, nous déterminerons si la phosphorylation joue un rôle dans la régulation de l'architecture de FtsZ. Pour cela,

nous travaillerons avec des souches délétées de StkP ou exprimant des variants de cette protéine (truncation du domaine kinase intracellulaire, des domaines PASTA extracellulaires, expression d'un variant K42M non fonctionnel pour l'activité kinase) (Fleurie et al., 2012), ainsi qu'avec des variants phosphomimétiques ou phosphoablatis de FtsZ et MapZ.

A l'aide de méthodes décrites dans Jacq et al., des données en PALM 1-couleur seront collectées sur des cellules fixées ou vivantes de ces différentes souches mutantes (délétion ou déplétion de FtsA, ZapA, SepF, EzrA, MapZ, StkP ; expression de mutants phosphomimétiques de StkP, MapZ et FtsZ) exprimant une fusion FtsZ-spDendra2 endogène pour générer des images de la nanostructure de l'anneau Z à différents stades du cycle cellulaire (Jacq et al., 2015). Dans les différentes souches mutantes, nous nous attendons à détecter des variations dans les dimensions de l'anneau Z, ses sous-structures et sa propension à former des amas protéiques. Ces variations nous informeront sur le rôle des différents partenaires de FtsZ dans la régulation de l'architecture de l'anneau Z.

## **2. Comment les partenaires de FtsZ régulent-ils l'architecture de l'anneau Z au niveau cellulaire et moléculaire ?**

Afin de comprendre comment les partenaires de FtsZ impliqués dans la régulation de l'architecture de l'anneau Z s'associent à l'anneau dans la cellule, je développerai l'usage de la microscopie super-résolue 2-couleurs (PALM/PALM ou PALM/dSTORM) chez le pneumocoque pour visualiser deux protéines dans une même cellule.

L'une des protéines sera fusionnée à la protéine photoconvertible spDendra2 ou à la protéine photoactivable PA-mCherry et l'autre protéine sera fusionnée à une protéine photoréversible verte (mGeosM ou rsKame) (Chang et al., 2012; Rosenbloom et al., 2014). Les données PALM seront d'abord collectées dans le canal de fluorescence rouge, puis dans le vert. Les données de fluorescence rouge et vertes seront ensuite traitées de façon séparées et diverses corrections seront appliquées (dérive, aberrations chromatiques, ...) (Georgieva et al., 2016). Les deux couleurs seront finalement regroupées dans l'image PALM finale et une analyse de co-localisation de cette image nous permettra de déterminer dans quelles régions (de fortes ou faibles densités) de l'anneau Z les partenaires de FtsZ s'assemblent. Ce développement a déjà été initié avec le couple FtsZ-EzrA et sera à terme appliqué à tous les couples protéiques d'intérêt. Dans le cas d'une non fonctionnalité des protéines de fusion, il est possible d'envisager un immunomarquage de FtsZ ou de la seconde protéine d'intérêt à l'aide d'anticorps disponibles au laboratoire (nous disposons d'une vingtaine d'anticorps dirigés contre les protéines de la division du pneumocoque). Dans ce cas, les anticorps seront couplés de façon chimique au fluorophore Alexa Fluor 647 (émission de fluorescence dans le rouge lointain), qui est utilisable en **dSTORM (direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy)**. Le dSTORM, technique cousine du PALM,

est basée sur le clignotement de marqueurs fluorescents (de type Alexa par exemple) en présence d'un tampon ayant des propriétés oxydo-réductrices. Un laser UV permet de contrôler le taux de clignotement des marqueurs, afin d'imager chaque fois une densité faible de molécules, comme pour le PALM. Les fluorophores de type Alexa offrent un large choix de couleurs fluorescentes et génèrent des signaux fluorescents très forts.

Pour comprendre comment les partenaires de FtsZ s'assemblent sur et/ou régulent l'assemblage de l'anneau Z au niveau moléculaire, il faudra déterminer la structure atomique de ces complexes. La structure du peptide C-terminal de FtsZ en complexe avec FtsA est déjà connue (code PDB 4A2A, (Szwedziak et al., 2012)) et celle de FtsZ en complexe avec MapZ est réalisée par l'équipe de C. Grangeasse. Nous tenterons donc uniquement de résoudre la structure de FtsZ en complexe avec ZapA, SepF ou EzrA si les expériences en PALM montrent un rôle de ces protéines dans l'architecture de l'anneau Z. Ces études structurales seront soutenues par des études de biochimie et de biophysique qui viseront à déterminer les régions d'interaction entre ces protéines. Des constructions recombinantes complètes et tronquées fusionnées à des étiquettes poly-histidine ou GST seront produites chez *E. coli* et purifiées, puis des études d'interaction entre les différents partenaires seront réalisées par thermophorèse à micro-échelle (MST pour "MicroScale Thermophoresis"). Les résultats fournis par ces études permettront de guider les essais de cristallisation: si les formes complètes des partenaires protéiques ne cristallisent pas, nous tenteront de cristalliser des formes tronquées dont l'interaction aura été validée par thermophorèse.

Après résolution de la structure de ces complexes protéiques, ils seront validés *in vitro* et *in vivo* par mutation des résidus impliqués dans l'interface d'interaction. La capacité des protéines mutantes à interagir *in vitro* sera testée par thermophorèse à micro-échelle après production des protéines mutantes chez *E. coli* et purification. En parallèle, ces mutations seront introduites *in vivo* et le phénotype des souches de pneumocoque mutantes sera étudié. En particulier, nous analyserons la forme des souches mutantes (microscopie en contraste de phase et microscopie électronique), leur taux de croissance (courbes de croissance), la localisation à basse et haute résolution des protéines mutées et des zones de synthèse de PG (utilisation d'acides aminés fluorescents) à l'aide de méthodes décrites précédemment (Fleurie et al., 2012; Jacq et al., 2015; Morlot et al., 2013).

### **3. Les amas de FtsZ sont-ils des points d'ancrage pour la machinerie de synthèse du PG ?**

EzrA est la protéine qui connecte, via GpsB, l'anneau Z à la machinerie de synthèse du PG, c'est-à-dire aux PBP (Claessen et al., 2008; Fleurie et al., 2014b). Pour déterminer si les amas de FtsZ servent de points d'ancrage à la machinerie de synthèse du PG, nous commencerons par étudier en PALM/dSTORM 2-couleurs le couple EzrA-FtsZ pour déterminer si les amas de FtsZ dans l'anneau Z co-localisent avec de possibles amas de EzrA. Cette analyse portera sur la totalité du cycle cellulaire du

pneumocoque. L'étude sera ensuite étendue aux couples protéiques FtsZ-GpsB et EzrA-GpsB pour étudier la co-localisation de ces protéines au cours du cycle cellulaire.

Pour comprendre les interactions établies par FtsZ, EzrA et GpsB au niveau moléculaire, nous réaliserons également une étude structurale de ces protéines. Nous observerons par microscopie électronique des filaments de FtsZ en présence d'EzrA et GpsB afin de déterminer si la connexion entre l'anneau Z et la machinerie de synthèse du PG implique une modulation de l'organisation des filaments de FtsZ par ces partenaires. Nous nous attendons par exemple à observer une stimulation ou une inhibition de la formation de faisceaux de filaments de FtsZ en présence de ces protéines. Pour obtenir des détails des interactions entre FtsZ, EzrA et GpsB à l'échelle atomique, nous tenterons de résoudre la structure cristallographique des complexes FtsZ-EzrA et EzrA-GpsB. Comme décrit dans la section précédente, les études structurales seront guidées par des études biochimiques et biophysiques visant à déterminer les régions d'interaction entre ces protéines, et validées par des études de mutagenèse *in vitro* et *in vivo*.

Les études en PALM seront ensuite étendues à PBP2b, qui est nécessaire à la synthèse de PG dédiée à l'élongation, et à PBP2x, qui est nécessaire à celle dédiée à la division. Les paires FtsZ-PBP2b et FtsZ-PBP2x seront étudiées en PALM/dSTORM 2-couleurs. Il est possible que les PBPs soient présentes en nombre de copies insuffisant dans la cellule pour réaliser une étude PALM. Dans ce cas, FtsZ sera fusionnée à une protéine phototransformable pour la visualiser en PALM et les PBPs seront détectées en dSTORM après immunomarquage par des anticorps couplés à de l'Alexa Fluor 647.

D'autres couples (EzrA-PBP2b, EzrA-PBP2x, GpsB-PBP2b, GpsB-PBP2x) seront également étudiés en PALM/dSTORM 2-couleurs pour définir une carte de co-localisation de ces protéines au cours du cycle cellulaire et déterminer si les zones de forte densité de molécules de FtsZ dans l'anneau servent de points d'assemblage de la machinerie de synthèse du PG.

#### **4. Quel est le degré d'indépendance spatiale et temporelle des machineries d'élongation et de division au cours du cycle cellulaire ? Quel est le mécanisme qui régule cette (in)dépendance ?**

Des études de localisation en 3D-SIM de PBP2x et de son activité de synthèse du PG ont montré que la machinerie de septation se désolidarise spatialement de la machinerie d'élongation au cours du cycle cellulaire et migre plus rapidement vers le centre du septum (Tsui et al., 2014). Nous ne savons toutefois pas encore à quel moment du cycle cellulaire se passe ce phénomène et quel est le mécanisme qui régule cette désolidarisation.

Pour répondre à la question temporelle, nous étudierons la co-localisation en PALM/dSTORM 2-couleur de paires de PBPs ou de protéines SEDS impliquées dans l'élongation et la septation (PBP2x-PBP2b, FtsW-RodA, PBP2x-RodA, PBP2b-FtsW) dans une souche de pneumocoque sauvage.

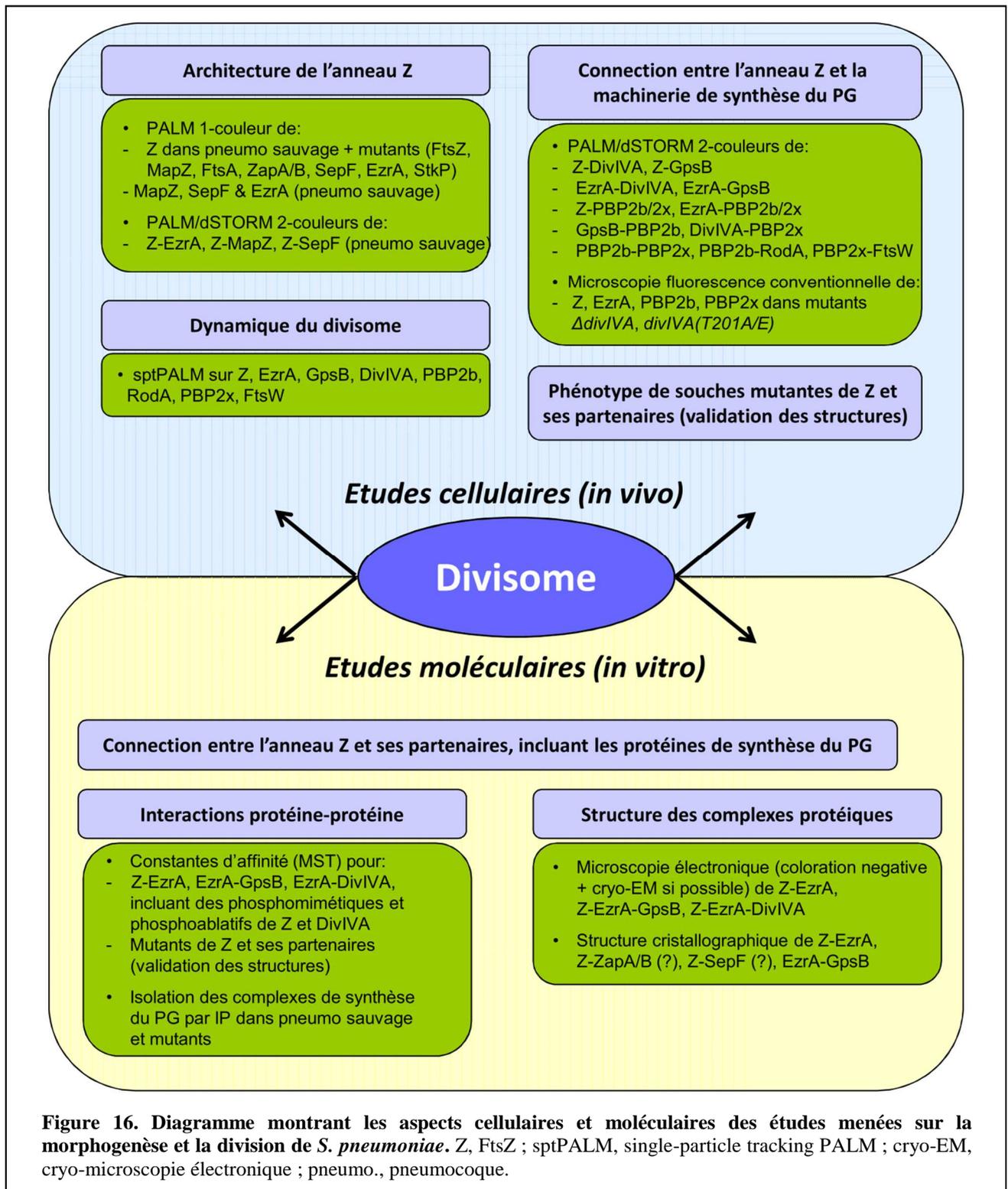
L'analyse du degré de co-localisation de ces paires protéiques au cours du cycle cellulaire permettra de déterminer à quel moment les machineries d'élongation et de septation se désolidarisent.

En ce qui concerne le mécanisme qui régule la désolidarisation des machineries d'élongation et de septation, il pourrait être basé sur un comportement dynamique différent entre les protéines dédiées à l'élongation et celle dédiées à la septation, ou encore à des interactions moléculaires qui modifieraient la localisation des synthèses du PG au cours du cycle cellulaire. Pour étudier ces questions, nous réaliserons les expériences de PALM/dSTORM 2-couleurs décrites dans le paragraphe précédent dans des souches de pneumocoque mutantes pour des protéines régulatrices de l'élongation et de la division (délétion de DivIVA, GpsB ou StkP, expression de variants phosphomimétiques et phosphoablatifs de DivIVA). En parallèle, nous réaliserons également des études en "sptPALM" (single-particle tracking PALM) qui permettent d'observer le mouvement d'une molécule unique dans une cellule vivante. Après photoconversion de quelques protéines fluorescentes dans le champ de microscopie, plusieurs images sont acquises au cours du temps. Le traitement informatique de ces images permet de reconstituer la trace de chaque molécule dans la cellule au cours du temps. Nous utiliserons cette méthode pour observer le comportement dynamique des protéines impliquées dans l'élongation (PBP2b, RodA) et le comparer à celui des protéines impliquées dans la septation (PBP2x, FtsW).

Puisque GpsB, DivIVA et StkP régulent le passage de la synthèse de PG dédiée à l'élongation vers celle dédiée à la division, nous nous attendons à observer des différences dans le degré de co-localisation ou dans la dynamique des paires protéiques élongation-division entre la souche sauvage et les souches mutantes.

Les techniques d'isolation des complexes d'élongation et de septation étant maîtrisées au laboratoire (Noirclerc-Savoye et al., 2005; Philippe et al., 2014; Zapun et al., 2012), les études PALM pourront être complétées par des expériences de biochimie visant à étudier la stabilité de ces complexes de synthèse du PG en présence de protéines régulatrices telles que StkP, GpsB ou DivIVA.

D'un point de vue fondamental, ce projet générera sur le long terme des données nécessaires à la compréhension des mécanismes de la morphogénèse et de la division bactérienne. D'un point de vue plus appliqué, ces données serviront également à la compréhension du mode d'action des antibiotiques présents, à l'identification de nouvelles cibles antibactériennes et molécules inhibitrices. Les données générées à l'échelle atomique pourront éventuellement servir à guider le dessin de molécules inhibitrices.



## **B. Morphogénèse de la spore chez *B. subtilis***

Notre récente étude des anneaux formés par SpoIIIAG constitue la première évidence structurale d'une fonction sécrétoire ou de transport passif pour le complexe SpoIII A-SpoIIQ. Dans les systèmes de sécrétion de type III, l'aiguille d'injection (structure filamentaire) est connectée à la plateforme d'assemblage de la membrane interne par une structure tubulaire. Par analogie, le pore formé par SpoIIIAG pourrait lui aussi accommoder une structure tubulaire et/ou filamentaire qui assurerait la sécrétion d'une molécule encore indéterminée dans la cellule mère. Toutefois, aucune protéine nécessaire à l'activation de  $\sigma_G$  n'a de similarité avec de telles protéines. L'existence d'une structure tubulaire et/ou filamentaire dans le complexe SpoIII A-SpoIIQ reste donc une question importante non résolue. Une autre hypothèse possible est que les protéines SpoIII A-SpoIIQ similaires aux composants des systèmes de sécrétion spécialisés forment un canal qui connecterait directement la cellule mère à la préspore, permettant le transport passif d'une molécule de la cellule mère vers la préspore, ou inversement. Nous pouvons enfin proposer une dernière hypothèse, qui est que le complexe SpoIII A-SpoIIQ ne transporte aucune molécule et assure uniquement l'adhésion entre les deux membranes qui séparent la cellule mère et la préspore. La poursuite de l'étude structurale et fonctionnelle du complexe SpoIII A-SpoIIQ permettra de déterminer lequel de ces modèles est correct et d'élucider la structure globale et le mécanisme d'assemblage de ce complexe.

De façon analogue à l'étude du complexe de division chez *S. pneumoniae*, j'adopterai une stratégie intégrant des techniques de biologie structurale (microscopie électronique et cristallographie des rayons X), de biochimie et biophysique (étude des interactions protéines-protéines par thermophorèse à micro-échelle) et d'imagerie cellulaire à basse et haute résolution (PALM) pour déterminer le mécanisme d'assemblage et l'architecture globale du complexe SpoIII A-SpoIIQ (Fig. 17).

Les questions adressées par ce projet seront les suivantes :

### **1. Quelle est le degré de similitude structurale entre les anneaux formés par SpoIIIAG et ceux formés par EscJ/PrgK dans les T3SS ?**

Pour finir de répondre à cette question, à laquelle nous avons déjà apporté des premiers éléments de réponses (Rodrigues et al., 2016a), nous allons déterminer la structure à haute résolution des anneaux formés par SpoIIIAG. La résolution des cristaux formés par les anneaux de SpoIIIAG étant limitée à 8 Å, notre stratégie consistera à déterminer la structure atomique d'une construction monomérique soluble de SpoIIIAG (mutant R209E) et à améliorer la résolution de la carte de densité des anneaux de SpoIIIAG obtenue par cryo-microscopie électronique (Rodrigues et al., 2016a). La structure atomique du monomère de SpoIIIAG pourra être obtenue par cristallographie des rayons X (si la construction SpoIIIAG(R209E) cristallise), ou par RMN puisque cette protéine est de petite taille (~19.7 kDa). L'étude RMN sera réalisée en collaboration avec l'équipe de RMN biomoléculaire de l'IBS. En ce qui concerne l'étude des anneaux de SpoIIIAG en microscopie électronique, nous augmenterons la diversité

d'orientation des anneaux sur les grilles de microscopie par ajout de petites molécules (glutaraldéhyde, détergents, ...). La structure atomique du protomère de SpoIIIAG sera ensuite placée dans la carte de densité électronique pour générer un modèle de l'anneau de SpoIIIAG à haute résolution.

## **2. SpoIIIAG forme-t-elle des pores dans les membranes ?**

SpoIIIAG possède un segment transmembranaire unique en position N-terminale et ce dernier ancre la protéine dans la membrane de la cellule mère (Fig. 15A). La forme complète membranaire de SpoIIIAG sera produite chez *E. coli*, solubilisée en présence de détergents et purifiée, puis observée directement en cryo-microscopie électronique. La reconstruction de la structure de cette forme membranaire de SpoIIIAG permettra de déterminer si la protéine forme des pores membranaires. Des protéoliposomes de SpoIIIAG pourront également être produits pour observation en microscopie électronique ou pour réaliser des tests de fuite : un petit fluorophore telle que la calcéïne sera emprisonné dans des liposomes à une concentration causant l'auto-extinction de sa fluorescence. Après incorporation de la forme membranaire de SpoIIIAG dans ces liposomes, une lecture de fluorescence sera réalisée dans le temps. Si les anneaux de SpoIIIAG forment des pores membranaires, alors les petites molécules fluorescentes seront libérées à l'extérieur des liposomes et la fluorescence de la solution augmentera. Pour ces expériences, nous bénéficierons de l'expertise de nombreuses équipes de l'IBS travaillant sur des protéines membranaires, dont certaines sur des canaux membranaires.

## **3. La protéine GerM, nécessaire à la localisation de SpoIIIAG, est-elle un composant du complexe SpoIIIA-SpoIIQ et forme-t-elle des anneaux ?**

Récemment, un nouveau partenaire des protéines SpoIIIA a été identifié. Il s'agit de la protéine GerM qui, avec SpoIIIAH, est nécessaire à la localisation de SpoIIQ et SpoIIIAG au niveau du septum de sporulation (Doan et al., 2009; Rodrigues et al., 2016b). GerM est une lipoprotéine composée de deux domaines GERM localisés dans l'espace intermembranaire (Rodrigues et al., 2016b), de fonction inconnue mais dont le repliement rappelle celui des domaines RBM ( $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ ).

Nous allons exprimer des formes recombinantes solubles de GerM contenant l'un ou l'autre, ou les deux domaines GERM et déterminer dans un premier temps la capacité de ces constructions à interagir physiquement *in vitro* avec SpoIIIAG, SpoIIIAH et SpoIIQ. Cette étude sera réalisée par thermophorèse à micro-échelle. En collaboration avec l'équipe de D. Rudner, nous déterminerons à l'aide d'expériences d'immunoprécipitations décrites précédemment si GerM appartient au complexe SpoIIIA-SpoIIQ ancré dans les membranes de *B. subtilis* (Doan et al., 2009).

Dans un second temps, nous testerons la capacité de GerM à former des anneaux oligomériques. Les différentes constructions recombinantes de GerM seront analysées par chromatographie de filtration

sur gel et les fractions d'élution à faible volume (correspondant à des objets protéiques de haut poids moléculaire) seront analysées par microscopie électronique en coloration négative. Si des anneaux de GerM sont détectés, nous tenterons alors de les cristalliser et de résoudre leur structure par cristallographie des rayons X, ou, comme pour SpoIIIAG, nous résoudrons leur structure en cryo-microscopie électronique.

#### **4. Quel est l'architecture globale du complexe SpoIII A-SpoII Q ?**

Nous tenterons de reconstituer progressivement le complexe SpoIII A-SpoII Q *in vitro* en ajoutant un ou plusieurs partenaires de SpoIIIAG à des anneaux préformés ou en cours de formation. Ces expériences seront dans un premier temps réalisées sur les formes solubles des protéines SpoIII A et SpoII Q puis sur les formes membranaires si ces dernières sont nécessaires à l'assemblage du complexe intégral. La structure du complexe ou sous-complexes reconstitués sera étudiée par microscopie électronique et/ou par cristallographie des rayons X. Une fois que le complexe ou les sous-complexes SpoIII A-SpoII Q seront reconstitués, leur fonction sécrétoire sera étudiée à l'aide de méthodes développées pour étudier la fonction sécrétoire des anneaux formés par SpoIIIAG.

La validation de toutes les interfaces protéiques identifiées par les techniques de biologie structurale sera réalisée *in vitro* par notre équipe. Des mutations seront introduites dans les résidus impliqués dans les interfaces protéiques, les protéines mutantes seront produites de façon recombinante chez *E. coli*, puis purifiées. La capacité des protéines mutantes à oligomériser ou à interagir avec leur(s) partenaires protéiques sera testée par thermophorèse à micro-échelle. En parallèle, ces mutations seront introduites *in vivo* par l'équipe de D. Rudner à Boston dans le cadre de la collaboration déjà établie pour l'étude de SpoIIIAG. Nos collaborateurs analyseront le phénotype des souches de *B. subtilis* mutantes, et en particulier leur capacité à activer  $\sigma^G$  et à produire des spores résistantes à la température à l'aide de méthodes décrites précédemment (Rodrigues et al., 2016a).

#### **5. Comment s'assemble le complexe SpoIII A-SpoII Q dans la cellule ?**

Pour répondre à cette question, j'envisage de réaliser une étude PALM du complexe SpoIII A-SpoII Q afin de déterminer (i) le nombre de complexes présents au niveau du septum, (ii) sa stoechiométrie et (iii) son architecture à l'échelle nanométrique dans la cellule ainsi que (iv) la position relative de chacun de ses composants. Des fusions fonctionnelles de SpoIIIAG, SpoIII AH et SpoII Q à des protéines fluorescentes existent déjà et la technique de PALM 1-couleur a déjà été utilisée par l'équipe de M. Nollmann à Montpellier pour étudier la localisation à haute résolution de protéines de la sporulation chez *B. subtilis* (Doan et al., 2009; Fiche et al., 2013; Rodrigues et al., 2016a). Les protocoles

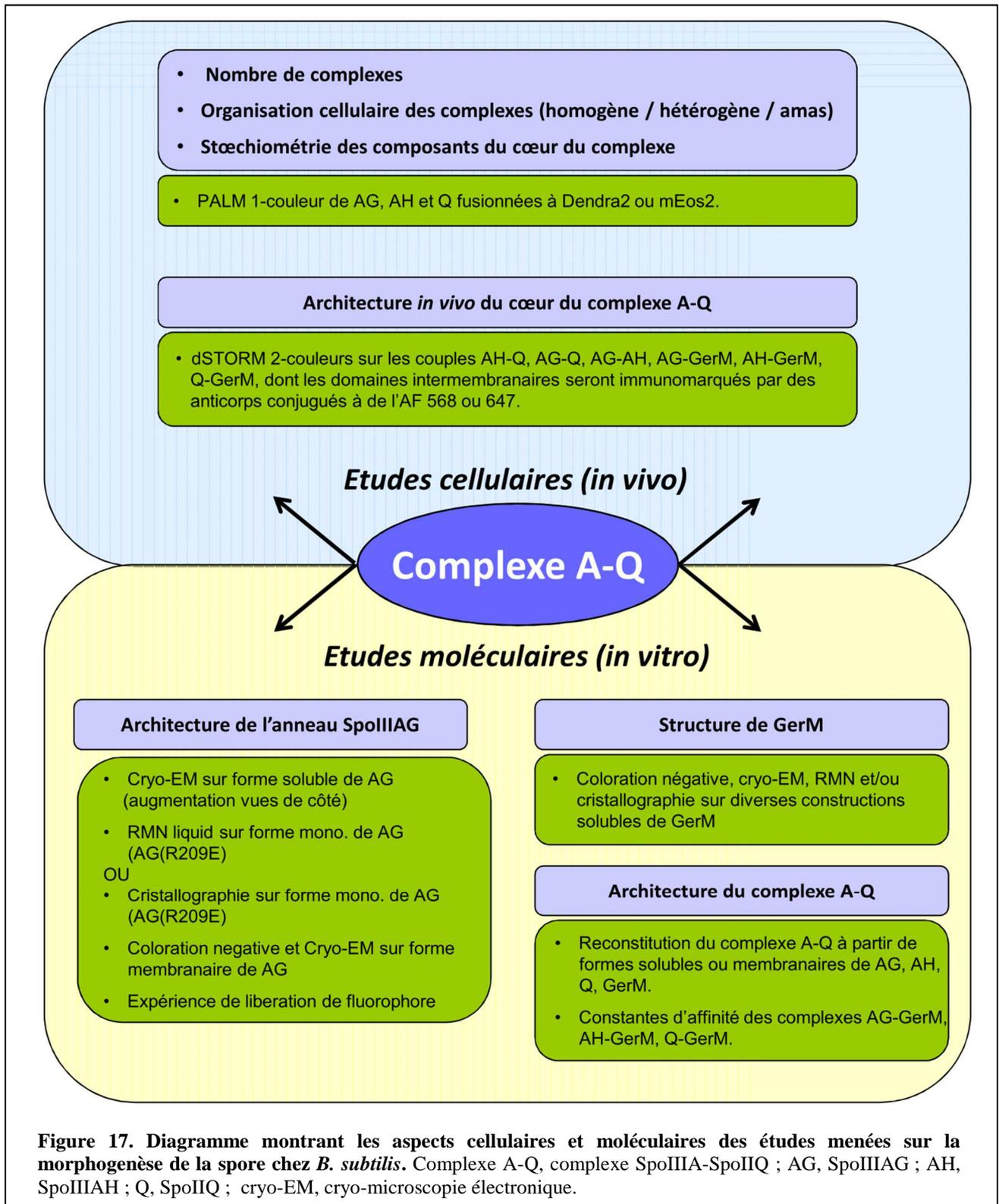
publiés devraient donc être relativement facilement transférables à l'étude PALM des protéines SpoIIIAG, SpoIII AH et SpoIIQ. Ces fusions cytoplasmiques ne seront pas envisageables avec GerM qui est une lipoprotéine sécrétée dans l'espace intermembranaire et à ce jour, il n'existe aucune protéine phototransformable tolérant le transport vers le milieu extracellulaire (à l'image de la superfolder GFP qui a été ingénierée pour tolérer la sécrétion dans le périplasme bactérien) et utilisable en PALM. GerM sera donc étudiée en microscopie super-résolue par dSTORM (voir ci-dessous).

Dans un premier temps, l'extrémité N-terminale (cytoplasmique) de SpoIIIAG, SpoIII AH et SpoIIQ sera fusionnée à Dendra2 ou mEos2 pour imager ces protéines en PALM 1-couleur à l'aide de méthodes décrites pour *B. subtilis* (Fiche et al., 2013) ou pour *S. pneumoniae* (Jacq et al., 2015). L'étude PALM de ces protéines nous renseignera sur l'organisation (homogène ou en amas) du complexe SpoIII A-SpoIIQ autour de la préspore, sur le nombre de complexes présents dans chaque amas et globalement autour de la préspore et sur la stœchiométrie *in vivo* des protéines étudiées.

Dans un deuxième temps, nous chercherons à déterminer la position relative de chacun des composants du complexe SpoIII A-SpoIIQ dans l'espace intermembranaire. Pour déterminer la position relative des protéines SpoIIIAG, SpoIII AH, SpoIIQ et GerM dans l'espace intermembranaire, il faudra immunomarquer leur domaine extracellulaire à l'aide d'anticorps couplés à de l'Alexa Fluor 568 ou 647. Les différents couples protéiques seront ensuite imagés et étudiés en dSTORM 2-couleurs (568/647 nm) à l'aide de méthodes décrites par Georgieva et al (Georgieva et al., 2016) pour déterminer la position relative de chacun des composants dans le complexe SpoIII A-SpoIIQ. Le couple SpoIII AH-SpoIIQ servira de contrôle positif avec une localisation de SpoIIQ qui devrait se positionner du côté de la préspore et une localisation de SpoIII AH qui devrait se localiser du côté de la cellule mère. En effet, SpoIIQ est produite par la préspore alors que SpoIII AH est produite par la cellule mère. Par ailleurs, les extrémités N-terminales de ces protéines dans la structure cristallographique du complexe SpoIII AH-SpoIIQ sont positionnées à l'opposé de l'interface (sur l'extérieur du complexe), ce qui suggère fortement que le domaine extracellulaire de SpoIIQ est positionné du côté de la préspore et celui de SpoIII AH du côté de la cellule mère.

Dans un premier temps, ces études seront menées sur le cœur SpoIIIAG-SpoIII AH-SpoIIQ-GerM du complexe SpoIII A-SpoIIQ mais à terme, l'objectif est d'étendre le projet aux autres protéines du complexe.

La pérennité de ce projet dépendra évidemment de l'obtention de financements et j'envisage de déposer une demande de financement ERC consolidating grant (individuelle) ou d'ANR internationale (collaboration avec l'équipe de D. Rudner à Boston) sur ce projet en 2018.





## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



- Aung, S., Shum, J., Abanes-De Mello, A., Broder, D.H., Fredlund-Gutierrez, J., Chiba, S., and Pogliano, K. (2007). Dual localization pathways for the engulfment proteins during *Bacillus subtilis* sporulation. *Mol. Microbiol.* *65*, 1534–1546.
- Baba, H., Kawamura, I., Kohda, C., Nomura, T., Ito, Y., Kimoto, T., Watanabe, I., Ichiyama, S., and Mitsuyama, M. (2001). Essential Role of Domain 4 of Pneumolysin from *Streptococcus pneumoniae* in Cytolytic Activity as Determined by Truncated Proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *281*, 37–44.
- Barendt, S.M., Sham, L.-T., and Winkler, M.E. (2011). Characterization of Mutants Deficient in the 1,d-Carboxypeptidase (DacB) and WalRK (VicRK) Regulon, Involved in Peptidoglycan Maturation of *Streptococcus pneumoniae* Serotype 2 Strain D39. *J. Bacteriol.* *193*, 2290–2300.
- Barreteau, H., Kovač, A., Boniface, A., Sova, M., Gobec, S., and Blanot, D. (2008). Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* *32*, 168–207.
- Bartual, S.G., Straume, D., Stamsås, G.A., Muñoz, I.G., Alfonso, C., Martínez-Ripoll, M., Håvarstein, L.S., and Hermoso, J.A. (2014). Structural basis of PcsB-mediated cell separation in *Streptococcus pneumoniae*. *Nat. Commun.* *5*, 3842.
- Berg, K.H., Stamsås, G.A., Straume, D., and Håvarstein, L.S. (2013). Effects of Low PBP2b Levels on Cell Morphology and Peptidoglycan Composition in *Streptococcus pneumoniae* R6. *J. Bacteriol.* *195*, 4342–4354.
- Bisson-Filho, A.W., Hsu, Y.-P., Squyres, G.R., Kuru, E., Wu, F., Jukes, C., Sun, Y., Dekker, C., Holden, S., VanNieuwenhze, M.S., et al. (2017). Treadmilling by FtsZ filaments drives peptidoglycan synthesis and bacterial cell division. *Science* *355*, 739–743.
- Biteen, J.S., Goley, E.D., Shapiro, L., and Moerner, W.E. (2012). Three-Dimensional Super-Resolution Imaging of the Midplane Protein FtsZ in Live *Caulobacter crescentus* Cells Using Astigmatism. *ChemPhysChem* *13*, 1007–1012.
- Blaauwen, T.D., Pedro, M.A. de, Nguyen-Distèche, M., and Ayala, J.A. (2008). Morphogenesis of rod-shaped sacculi. *FEMS Microbiol. Rev.* *32*, 321–344.
- Black, S., Shinefield, H., Cohen, R., Floret, D., Gaudelus, J., Olivier, C., and Reinert, P. (2004). Efficacité du vaccin pneumococcique heptavalent conjugué (Prevenar®) contre les infections invasives à pneumocoque : bénéfique attendu pour les enfants en France. *Arch. Pédiatrie* *11*, 843–853.
- Bouhss, A., Trunkfield, A.E., Bugg, T.D.H., and Mengin-Lecreulx, D. (2008). The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS Microbiol. Rev.* *32*, 208–233.
- Buss, J., Coltharp, C., Huang, T., Pohlmeier, C., Wang, S.-C., Hatem, C., and Xiao, J. (2013). In vivo organization of the FtsZ-ring by ZapA and ZapB revealed by quantitative super-resolution microscopy. *Mol. Microbiol.* *89*, 1099–1120.
- Camp, A.H., and Losick, R. (2008). A novel pathway of intercellular signalling in *Bacillus subtilis* involves a protein with similarity to a component of type III secretion channels. *Mol. Microbiol.* *69*, 402–417.
- Camp, A.H., and Losick, R. (2009). A feeding tube model for activation of a cell-specific transcription factor during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* *23*, 1014–1024.
- Cattoni, D., Fiche, J., and Nöllmann, M. (2012). Single-molecule super-resolution imaging in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* *15*, 758–763.

- Chang, H., Zhang, M., Ji, W., Chen, J., Zhang, Y., Liu, B., Lu, J., Zhang, J., Xu, P., and Xu, T. (2012). A unique series of reversibly switchable fluorescent proteins with beneficial properties for various applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 4455–4460.
- Chastanet, A., and Losick, R. (2007). Engulfment during sporulation in *Bacillus subtilis* is governed by a multi-protein complex containing tandemly acting autolysins. *Mol. Microbiol.* *64*, 139–152.
- Chung, K.-M., Hsu, H.-H., Yeh, H.-Y., and Chang, B.-Y. (2007). Mechanism of Regulation of Prokaryotic Tubulin-like GTPase FtsZ by Membrane Protein EzrA. *J. Biol. Chem.* *282*, 14891–14897.
- Claessen, D., Emmins, R., Hamoen, L.W., Daniel, R.A., Errington, J., and Edwards, D.H. (2008). Control of the cell elongation–division cycle by shuttling of PBP1 protein in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* *68*, 1029–1046.
- Cleverley, R.M., Barrett, J.R., Baslé, A., Bui, N.K., Hewitt, L., Solovyova, A., Xu, Z.-Q., Daniel, R.A., Dixon, N.E., Harry, E.J., et al. (2014). Structure and function of a spectrin-like regulator of bacterial cytokinesis. *Nat. Commun.* *5*, 5421.
- Coltharp, C., and Xiao, J. (2012). Superresolution microscopy for microbiology. *Cell. Microbiol.* *14*, 1808–1818.
- Doan, T., Marquis, K.A., and Rudner, D.Z. (2005). Subcellular localization of a sporulation membrane protein is achieved through a network of interactions along and across the septum. *Mol. Microbiol.* *55*, 1767–1781.
- Doan, T., Morlot, C., Meisner, J., Serrano, M., Henriques, A.O., Jr, C.P.M., and Rudner, D.Z. (2009). Novel Secretion Apparatus Maintains Spore Integrity and Developmental Gene Expression in *Bacillus subtilis*. *PLOS Genet* *5*, e1000566.
- Eberhardt, A., Wu, L.J., Errington, J., Vollmer, W., and Veening, J.-W. (2009). Cellular localization of choline-utilization proteins in *Streptococcus pneumoniae* using novel fluorescent reporter systems. *Mol. Microbiol.* *74*, 395–408.
- Egan, A.J.F., and Vollmer, W. (2013). The physiology of bacterial cell division. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1277*, 8–28.
- Erickson, H.P., Anderson, D.E., and Osawa, M. (2010). FtsZ in Bacterial Cytokinesis: Cytoskeleton and Force Generator All in One. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *74*, 504–528.
- Errington, J. (2003). Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat. Rev. Microbiol.* *1*, 117–126.
- Fadda, D., Pischedda, C., Caldara, F., Whalen, M.B., Anderluzzi, D., Domenici, E., and Massidda, O. (2003). Characterization of divIVA and Other Genes Located in the Chromosomal Region Downstream of the dcw Cluster in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* *185*, 6209–6214.
- Fiche, J.-B., Cattoni, D.I., Diekmann, N., Langerak, J.M., Clerte, C., Royer, C.A., Margeat, E., Doan, T., and Nöllmann, M. (2013). Recruitment, Assembly, and Molecular Architecture of the SpoIIIE DNA Pump Revealed by Superresolution Microscopy. *PLOS Biol.* *11*, e1001557.
- Fleurie, A., Cluzel, C., Guiral, S., Freton, C., Galisson, F., Zanella-Cleon, I., Di Guilmi, A.-M., and Grangeasse, C. (2012). Mutational dissection of the S/T-kinase StkP reveals crucial roles in cell division of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* *83*, 746–758.

- Fleurie, A., Lesterlin, C., Manuse, S., Zhao, C., Cluzel, C., Lavergne, J.-P., Franz-Wachtel, M., Macek, B., Combet, C., Kuru, E., et al. (2014a). MapZ marks the division sites and positions FtsZ rings in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature* *516*, 259–262.
- Fleurie, A., Manuse, S., Zhao, C., Campo, N., Cluzel, C., Lavergne, J.-P., Freton, C., Combet, C., Guiral, S., Soufi, B., et al. (2014b). Interplay of the Serine/Threonine-Kinase StkP and the Paralogs DivIVA and GpsB in Pneumococcal Cell Elongation and Division. *PLOS Genet* *10*, e1004275.
- Frandsen, N., and Stragier, P. (1995). Identification and characterization of the *Bacillus subtilis* spoIIP locus. *J. Bacteriol.* *177*, 716–722.
- Fu, G., Huang, T., Buss, J., Coltharp, C., Hensel, Z., and Xiao, J. (2010). In Vivo Structure of the *E. coli* FtsZ-ring Revealed by Photoactivated Localization Microscopy (PALM). *PLOS ONE* *5*, e12680.
- Gaillat, J. (1998). [Epidemiology of systemic *Streptococcus pneumoniae* infections]. *Presse Medicale Paris Fr.* *1983 27 Suppl 1*, 9–16.
- Georgieva, M., Cattoni, D.I., Fiche, J.-B., Mutin, T., Chamousset, D., and Nollmann, M. (2016). Nanometer resolved single-molecule colocalization of nuclear factors by two-color super resolution microscopy imaging. *Methods* *105*, 44–55.
- Ghuysen, J.M. (1991). Serine Beta-Lactamases and Penicillin-Binding Proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* *45*, 37–67.
- Grangeasse, C., and Lesterlin, C. (2015). Mapping mid-cell: MapZ shows the way. *Cell Cycle Georget. Tex* *14*, 937–938.
- Gueiros-Filho, F.J., and Losick, R. (2002). A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. *Genes Dev.* *16*, 2544–2556.
- Gündoğdu, M.E., Kawai, Y., Pavlendova, N., Ogasawara, N., Errington, J., Scheffers, D.-J., and Hamoen, L.W. (2011). Large ring polymers align FtsZ polymers for normal septum formation. *EMBO J.* *30*, 617.
- Haeusser, D.P., Schwartz, R.L., Smith, A.M., Oates, M.E., and Levin, P.A. (2004). EzrA prevents aberrant cell division by modulating assembly of the cytoskeletal protein FtsZ. *Mol. Microbiol.* *52*, 801–814.
- Heidrich, C., Templin, M.F., Ursinus, A., Merdanovic, M., Berger, J., Schwarz, H., De Pedro, M.A., and Höltje, J.-V. (2001). Involvement of N-acetylmuramyl-L-alanine amidases in cell separation and antibiotic-induced autolysis of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* *41*, 167–178.
- Heijenoort, J. van (2011). Peptidoglycan Hydrolases of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *75*, 636–663.
- Herbold, D.R., and Glaser, L. (1975). *Bacillus subtilis* N-acetylmuramic acid L-alanine amidase. *J. Biol. Chem.* *250*, 1676–1682.
- Higgins, D., and Dworkin, J. (2012). Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *FEMS Microbiol. Rev.* *36*, 131–148.
- Hilbert, D.W., and Piggot, P.J. (2004). Compartmentalization of Gene Expression during *Bacillus subtilis* Spore Formation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *68*, 234–262.
- Hirst, R.A., Kadioglu, A., O’callaghan, C., and Andrew, P.W. (2004). The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. *Clin. Exp. Immunol.* *138*, 195–201.

- Holden, S.J., Pengo, T., Meibom, K.L., Fernandez, C.F., Collier, J., and Manley, S. (2014). High throughput 3D super-resolution microscopy reveals *Caulobacter crescentus* in vivo Z-ring organization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 4566–4571.
- Holečková, N., Doubravová, L., Massidda, O., Molle, V., Buriánková, K., Benada, O., Kofroňová, O., Ulrych, A., and Branny, P. (2015). LocZ Is a New Cell Division Protein Involved in Proper Septum Placement in *Streptococcus pneumoniae*. *mBio* *6*:e01700-14.
- Jacq, M., Adam, V., Bourgeois, D., Moriscot, C., Guilmi, A.-M.D., Vernet, T., and Morlot, C. (2015). Remodeling of the Z-Ring Nanostructure during the *Streptococcus pneumoniae* Cell Cycle Revealed by Photoactivated Localization Microscopy. *mBio* *6*(4)
- Jerabek-Willemsen, M., Wienken, C.J., Braun, D., Baaske, P., and Duhr, S. (2011). Molecular Interaction Studies Using Microscale Thermophoresis. *ASSAY Drug Dev. Technol.* *9*, 342–353.
- Kellner, E.M., Decatur, A., and Moran, J., Charles P. (1996). Two-stage regulation of an anti-sigma factor determines developmental fate during bacterial endospore formation. *Mol. Microbiol.* *21*, 913–924.
- Kouidmi, I., Levesque, R.C., and Paradis-Bleau, C. (2014). The biology of Mur ligases as an antibacterial target. *Mol. Microbiol.* *94*, 242–253.
- Land, A.D., and Winkler, M.E. (2011). The Requirement for Pneumococcal MreC and MreD Is Relieved by Inactivation of the Gene Encoding PBP1a. *J. Bacteriol.* *193*, 4166–4179.
- Land, A.D., Tsui, H.-C.T., Kocaoglu, O., Vella, S.A., Shaw, S.L., Keen, S.K., Sham, L.-T., Carlson, E.E., and Winkler, M.E. (2013). Requirement of essential Pbp2x and GpsB for septal ring closure in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Mol. Microbiol.* *90*, 939–955.
- Levdikov, V.M., Blagova, E.V., McFeat, A., Fogg, M.J., Wilson, K.S., and Wilkinson, A.J. (2012). Structure of components of an intercellular channel complex in sporulating *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 5441–5445.
- Levin, P.A., Kurtser, I.G., and Grossman, A.D. (1999). Identification and characterization of a negative regulator of FtsZ ring formation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *96*, 9642–9647.
- Li, Y., Hsin, J., Zhao, L., Cheng, Y., Shang, W., Huang, K.C., Wang, H.-W., and Ye, S. (2013). FtsZ Protofilaments Use a Hinge-Opening Mechanism for Constrictive Force Generation. *Science* *341*, 392–395.
- List, F., Vega, M.C., Razeto, A., Häger, M.C., Sterner, R., and Wilmanns, M. (2012). Catalysis Uncoupling in a Glutamine Amidotransferase Bienenzyme by Unblocking the Glutaminase Active Site. *Chem. Biol.* *19*, 1589–1599.
- Londoño-Vallejo, J.-A., Fréhel, C., and Stragier, P. (1997). spoIIQ, a forespore-expressed gene required for engulfment in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* *24*, 29–39.
- Low, H.H., Moncrieffe, M.C., and Löwe, J. (2004). The Crystal Structure of ZapA and its Modulation of FtsZ Polymerisation. *J. Mol. Biol.* *341*, 839–852.
- Macheboeuf, P., Contreras-Martel, C., Job, V., Dideberg, O., and Dessen, A. (2006). Penicillin Binding Proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. *FEMS Microbiol. Rev.* *30*, 673–691.

- Manuse, S., Jean, N.L., Guinot, M., Lavergne, J.-P., Laguri, C., Bougault, C.M., VanNieuwenhze, M.S., Grangeasse, C., and Simorre, J.-P. (2016a). Structure–function analysis of the extracellular domain of the pneumococcal cell division site positioning protein MapZ. *Nat. Commun.* *7*, 12071.
- Manuse, S., Fleurie, A., Zucchini, L., Lesterlin, C., and Grangeasse, C. (2016b). Role of eukaryotic-like serine/threonine kinases in bacterial cell division and morphogenesis. *FEMS Microbiol. Rev.* *40*, 41–56.
- Mattei, P.-J., Neves, D., and Dessen, A. (2010). Bridging cell wall biosynthesis and bacterial morphogenesis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *20*, 749–755.
- Meeske, A.J., Riley, E.P., Robins, W.P., Uehara, T., Mekalanos, J.J., Kahne, D., Walker, S., Kruse, A.C., Bernhardt, T.G., and Rudner, D.Z. (2016). SEDS proteins are a widespread family of bacterial cell wall polymerases. *Nature* *537*, 634–638.
- Meier, E.L., and Goley, E.D. (2014). Form and function of the bacterial cytokinetic ring. *Curr. Opin. Cell Biol.* *26*, 19–27.
- Meisner, J., Wang, X., Serrano, M., Henriques, A.O., and Moran, C.P. (2008). A channel connecting the mother cell and forespore during bacterial endospore formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 15100–15105.
- Meisner, J., Maehigashi, T., André, I., Dunham, C.M., and Moran, C.P. (2012). Structure of the basal components of a bacterial transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 5446–5451.
- Mello, A.A.-D., Sun, Y.-L., Aung, S., and Pogliano, K. (2002). A cytoskeleton-like role for the bacterial cell wall during engulfment of the *Bacillus subtilis* forespore. *Genes Dev.* *16*, 3253–3264.
- Mohammadi, T., Dam, V. van, Sijbrandi, R., Vernet, T., Zapun, A., Bouhss, A., Bruin, M.D., Nguyen-Distèche, M., Kruijff, B. de, and Breukink, E. (2011). Identification of FtsW as a transporter of lipid-linked cell wall precursors across the membrane. *EMBO J.* *30*, 1425–1432.
- Morlot, C., Zapun, A., Dideberg, O., and Vernet, T. (2003). Growth and division of *Streptococcus pneumoniae*: localization of the high molecular weight penicillin-binding proteins during the cell cycle. *Mol. Microbiol.* *50*, 845–855.
- Morlot, C., Noirclerc-Savoye, M., Zapun, A., Dideberg, O., and Vernet, T. (2004). The d,d-carboxypeptidase PBP3 organizes the division process of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* *51*, 1641–1648.
- Morlot, C., Pernot, L., Gouellec, A.L., Guilmi, A.M.D., Vernet, T., Dideberg, O., and Dessen, A. (2005). Crystal Structure of a Peptidoglycan Synthesis Regulatory Factor (PBP3) from *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* *280*, 15984–15991.
- Morlot, C., Hemrika, W., Romijn, R.A., Gros, P., Cusack, S., and McCarthy, A.A. (2007a). Cloning, expression, crystallization and preliminary X-ray analysis of the first two Ig domains from human Roundabout 1 (Robo1). *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* *63*, 689–691.
- Morlot, C., Hemrika, W., Romijn, R.A., Gros, P., Cusack, S., and McCarthy, A.A. (2007b). Production of Slit2 LRR domains in mammalian cells for structural studies and the structure of human Slit2 domain 3. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *63*, 961–968.
- Morlot, C., Thielens, N.M., Ravelli, R.B.G., Hemrika, W., Romijn, R.A., Gros, P., Cusack, S., and McCarthy, A.A. (2007c). Structural insights into the Slit-Robo complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 14923–14928.

- Morlot, C., Uehara, T., Marquis, K.A., Bernhardt, T.G., and Rudner, D.Z. (2010). A highly coordinated cell wall degradation machine governs spore morphogenesis in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* *24*, 411–422.
- Morlot, C., Bayle, L., Jacq, M., Fleurie, A., Tourcier, G., Galisson, F., Vernet, T., Grangeasse, C., and Di Guilmi, A.M. (2013). Interaction of Penicillin-Binding Protein 2x and Ser/Thr protein kinase StkP, two key players in *Streptococcus pneumoniae* R6 morphogenesis. *Mol. Microbiol.* *90*, 88–102.
- Münch, D., Roemer, T., Lee, S.H., Engeser, M., Sahl, H.G., and Schneider, T. (2012). Identification and in vitro Analysis of the GatD/MurT Enzyme-Complex Catalyzing Lipid II Amidation in *Staphylococcus aureus*. *PLOS Pathog* *8*, e1002509.
- Nelson, D.E., and Young, K.D. (2001). Contributions of PBP 5 and Carboxypeptidase Penicillin Binding Proteins to Maintenance of Cell Shape in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *183*, 3055–3064.
- Ng, W.-L., Kazmierczak, K.M., and Winkler, M.E. (2004). Defective cell wall synthesis in *Streptococcus pneumoniae* R6 depleted for the essential PcsB putative murein hydrolase or the VicR (YycF) response regulator. *Mol. Microbiol.* *53*, 1161–1175.
- Noirclerc-Savoie, M., Morlot, C., Gérard, P., Vernet, T., and Zapun, A. (2003). Expression and purification of FtsW and RodA from *Streptococcus pneumoniae*, two membrane proteins involved in cell division and cell growth, respectively. *Protein Expr. Purif.* *30*, 18–25.
- Noirclerc-Savoie, M., Le Gouëllec, A., Morlot, C., Dideberg, O., Vernet, T., and Zapun, A. (2005). In vitro reconstitution of a trimeric complex of DivIB, DivIC and FtsL, and their transient co-localization at the division site in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* *55*, 413–424.
- Noirclerc-Savoie, M., Lantez, V., Signor, L., Philippe, J., Vernet, T., and Zapun, A. (2013). Reconstitution of Membrane Protein Complexes Involved in Pneumococcal Septal Cell Wall Assembly. *PLOS ONE* *8*, e75522.
- van Opijnen, T., Bodi, K.L., and Camilli, A. (2009). Tn-seq: high-throughput parallel sequencing for fitness and genetic interaction studies in microorganisms. *Nat. Methods* *6*, 767–772.
- Ortiz, C., Natale, P., Cueto, L., and Vicente, M. (2016). The keepers of the ring: regulators of FtsZ assembly. *FEMS Microbiol. Rev.* *40*, 57–67.
- Pagliari, E., Dublet, B., Frehel, C., Dideberg, O., T, V., and Am, D.G. (2008). The Inactivation of a New Peptidoglycan Hydrolase Pmp23 Leads to Abnormal Septum Formation in *Streptococcus pneumoniae*. *Open Microbiol. J.* *2*, 107–114.
- Peters, N.T., Morlot, C., Yang, D.C., Uehara, T., Vernet, T., and Bernhardt, T.G. (2013). Structure–function analysis of the LytM domain of EnvC, an activator of cell wall remodelling at the *Escherichia coli* division site. *Mol. Microbiol.* *89*, 690–701.
- Philippe, J., Vernet, T., and Zapun, A. (2014). The Elongation of *Ovococci*. *Microb. Drug Resist.* *20*, 215–221.
- Philippe, J., Gallet, B., Morlot, C., Denapate, D., Hakenbeck, R., Chen, Y., Vernet, T., and Zapun, A. (2015). Mechanism of  $\beta$ -Lactam Action in *Streptococcus pneumoniae*: the Piperacillin Paradox. *Antimicrob. Agents Chemother.* *59*, 609–621.
- Rodrigues, C.D.A., Henry, X., Neumann, E., Kurauskas, V., Bellard, L., Fichou, Y., Schanda, P., Schoehn, G., Rudner, D.Z., and Morlot, C. (2016a). A ring-shaped conduit connects the mother cell and forespore during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *113*, 11585–11590.

- Rodrigues, C.D.A., Ramírez-Guadiana, F.H., Meeske, A.J., Wang, X., and Rudner, D.Z. (2016b). GerM is required to assemble the basal platform of the SpoIIIA–SpoIIQ transenvelope complex during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* *102*, 260–273.
- Rosenbloom, A.B., Lee, S.-H., To, M., Lee, A., Shin, J.Y., and Bustamante, C. (2014). Optimized two-color super resolution imaging of Drp1 during mitochondrial fission with a slow-switching Dronpa variant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 13093–13098.
- Rudner, D.Z., and Losick, R. (2001). Morphological Coupling in Development: Lessons from Prokaryotes. *Dev. Cell* *1*, 733–742.
- Ruiz, N. (2016). Lipid Flippases for Bacterial Peptidoglycan Biosynthesis. *Lipid Insights* *2015*, 21–31.
- Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J.A., and Charlier, P. (2008). The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* *32*, 234–258.
- Schraidt, O., and Marlovits, T.C. (2011). Three-Dimensional Model of Salmonella's Needle Complex at Subnanometer Resolution. *Science* *331*, 1192–1195.
- Schuster, C., Dobrinski, B., and Hakenbeck, R. (1990). Unusual septum formation in *Streptococcus pneumoniae* mutants with an alteration in the D,D-carboxypeptidase penicillin-binding protein 3. *J. Bacteriol.* *172*, 6499–6505.
- Sengupta, P., van Engelenburg, S.B., and Lippincott-Schwartz, J. (2014). Superresolution Imaging of Biological Systems Using Photoactivated Localization Microscopy. *Chem. Rev.* *114*, 3189–3202.
- Shah, I.M., Laaberki, M.-H., Popham, D.L., and Dworkin, J. (2008). A Eukaryotic-like Ser/Thr Kinase Signals Bacteria to Exit Dormancy in Response to Peptidoglycan Fragments. *Cell* *135*, 486–496.
- Sham, L.-T., Barendt, S.M., Kopecky, K.E., and Winkler, M.E. (2011). Essential PcsB putative peptidoglycan hydrolase interacts with the essential FtsXSpn cell division protein in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, E1061–E1069.
- Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N.G., Palmer, A.E., and Tsien, R.Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* *22*, 1567–1572.
- Singh, J.K., Makde, R.D., Kumar, V., and Panda, D. (2007). A Membrane Protein, EzrA, Regulates Assembly Dynamics of FtsZ by Interacting with the C-Terminal Tail of FtsZ. *Biochemistry (Mosc.)* *46*, 11013–11022.
- Singh, J.K., Makde, R.D., Kumar, V., and Panda, D. (2008). SepF Increases the Assembly and Bundling of FtsZ Polymers and Stabilizes FtsZ Protofilaments by Binding along Its Length. *J. Biol. Chem.* *283*, 31116–31124.
- Steele, V.R., Bottomley, A.L., Garcia-Lara, J., Kasturiarachchi, J., and Foster, S.J. (2011). Multiple essential roles for EzrA in cell division of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* *80*, 542–555.
- Sung, C.K., Li, H., Claverys, J.P., and Morrison, D.A. (2001). An rpsL Cassette, Janus, for Gene Replacement through Negative Selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl. Environ. Microbiol.* *67*, 5190–5196.
- Suzuki, H., Yonekura, K., and Namba, K. (2004). Structure of the Rotor of the Bacterial Flagellar Motor Revealed by Electron Cryomicroscopy and Single-particle Image Analysis. *J. Mol. Biol.* *337*, 105–113.

- Szwedziak, P., and Löwe, J. (2013). Do the divisome and elongasome share a common evolutionary past? *Curr. Opin. Microbiol.* *16*, 745–751.
- Szwedziak, P., Wang, Q., Freund, S.M., and Löwe, J. (2012). FtsA forms actin-like protofilaments. *EMBO J.* *31*, 2249–2260.
- Szwedziak, P., Wang, Q., Bharat, T.A.M., Tsim, M., and Löwe, J. (2014). Architecture of the ring formed by the tubulin homologue FtsZ in bacterial cell division. *eLife* *3*, e04601.
- Tan, I.S., and Ramamurthi, K.S. (2014). Spore formation in *Bacillus subtilis*. *Environ. Microbiol. Rep.* *6*, 212–225.
- Tsui, H.-C.T., Boersma, M.J., Vella, S.A., Kocaoglu, O., Kuru, E., Peceny, J.K., Carlson, E.E., VanNieuwenhze, M.S., Brun, Y.V., Shaw, S.L., et al. (2014). Pbp2x localizes separately from Pbp2b and other peptidoglycan synthesis proteins during later stages of cell division of *Streptococcus pneumoniae* D39. *Mol. Microbiol.* *94*, 21–40.
- Tsui, H.-C.T., Zheng, J.J., Magallon, A.N., Ryan, J.D., Yunck, R., Rued, B.E., Bernhardt, T.G., and Winkler, M.E. (2016). Suppression of a deletion mutation in the gene encoding essential PBP2b reveals a new lytic transglycosylase involved in peripheral peptidoglycan synthesis in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Mol. Microbiol.* *100*, 1039–1065.
- Uehara, T., Dinh, T., and Bernhardt, T.G. (2009). LytM-Domain Factors Are Required for Daughter Cell Separation and Rapid Ampicillin-Induced Lysis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *191*, 5094–5107.
- Uehara, T., Parzych, K.R., Dinh, T., and Bernhardt, T.G. (2010). Daughter cell separation is controlled by cytokinetic ring-activated cell wall hydrolysis. *EMBO J.* *29*, 1412–1422.
- Vollmer, W., Blanot, D., and Pedro, M.A.D. (2008a). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews* *32*, 149–167.
- Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P., and Foster, S. (2008b). Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol. Rev.* *32*, 259–286.
- Yang, D.C., Tan, K., Joachimiak, A., and Bernhardt, T.G. (2012). A conformational switch controls cell wall-remodelling enzymes required for bacterial cell division. *Mol. Microbiol.* *85*, 768–781.
- Yang, X., Lyu, Z., Miguel, A., McQuillen, R., Huang, K.C., and Xiao, J. (2017). GTPase activity-coupled treadmilling of the bacterial tubulin FtsZ organizes septal cell wall synthesis. *Science* *355*, 744–747.
- Yip, C.K., Kimbrough, T.G., Felise, H.B., Vuckovic, M., Thomas, N.A., Pfuetzner, R.A., Frey, E.A., Brett Finlay, B., Miller, S.I., and Strynadka, N.C.J. (2005). Structural characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly. *Nature* *435*, 702–707.
- Yunck, R., Cho, H., and Bernhardt, T.G. (2016). Identification of MltG as a potential terminase for peptidoglycan polymerization in bacteria. *Mol. Microbiol.* *99*, 700–718.
- Zapun, A., Noireclerc-Savoie, M., Helassa, N., and Vernet, T. (2012). Peptidoglycan Assembly Machines: The Biochemical Evidence. *Microb. Drug Resist.* *18*, 256–260.
- Zapun, A., Philippe, J., Abrahams, K.A., Signor, L., Roper, D.I., Breukink, E., and Vernet, T. (2013). In vitro Reconstitution of Peptidoglycan Assembly from the Gram-Positive Pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *ACS Chem. Biol.* *8*, 2688–2696.

**ANNEXES :**  
**PREMIERE PAGE DES ARTICLES**  
**PUBLIES**

# Growth and division of *Streptococcus pneumoniae*: localization of the high molecular weight penicillin-binding proteins during the cell cycle

Cécile Morlot, André Zapun, Otto Dideberg and Thierry Vernet\*

Institut de Biologie Structurale J. -P. Ebel (CEA/CNRS/UJF, UMR 5075), 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1, France.

## Summary

The bacterial peptidoglycan, the main component of the cell wall, is synthesized by the penicillin-binding proteins (PBPs). We used immunofluorescence microscopy to determine the cellular localization of all the high molecular weight PBPs of the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*, for a wild type and for several PBP-deficient strains. Progression through the cell cycle was investigated by the simultaneous labelling of DNA and the FtsZ protein. Our main findings are: (i) the temporal dissociation of cell wall synthesis, inferred by the localization of PBP2x and PBP1a, from the constriction of the FtsZ-ring; (ii) the localization of PBP2b and PBP2a at duplicated equatorial sites indicating the existence of peripheral peptidoglycan synthesis, which implies a similarity between the mechanism of cell division in bacilli and streptococci; (iii) the abnormal localization of some class A PBPs in PBP-defective mutants which may explain the apparent redundancy of these proteins in *S. pneumoniae*.

## Introduction

The peptidoglycan is the principal stress bearing and shape-determining constituent of the cell wall and its integrity is essential for bacteria. It is a molecular mesh of glycan strands of repeating disaccharide units cross-linked by peptide bridges. Several high molecular weight penicillin-binding proteins (PBPs) participate in the synthesis of the peptidoglycan through glycosyltransferase activities, which catalyse polymerization of glycan strands, and through transpeptidase activities, which form the peptide bridges. Class A PBPs possess both glycosyltrans-

ferase and transpeptidase activities, whereas class B PBPs are monofunctional transpeptidases (Ghuysen, 1991). Low molecular weight PBPs constitute a third group with a D,D-carboxypeptidase activity.  $\beta$ -Lactam antibiotics, such as penicillins and cephalosporins, inhibit both the transpeptidase and the D,D-carboxypeptidase reactions.

Cell wall synthesis can be grossly divided in two stages: the longitudinal wall growth (or elongation, as most studies have dealt with rod-shaped bacteria that double in length during this part of wall synthesis) and the wall growth linked to cell division or septation. Bacterial genomes generally encode two PBPs of class B, one involved in each stage of the peptidoglycan synthesis.

In *Escherichia coli*, PBP3 (FtsI) belongs to a group of essential proteins involved in division (Nanninga, 1991; Bramhill, 1997). This set of proteins, conserved in all cell wall synthesizing eubacteria, are thought to form a complex coordinating nucleoid segregation, membrane constriction, septal peptidoglycan synthesis and possibly the final event of membrane fusion. Genetic and localization studies in *E. coli* and *Bacillus subtilis* showed that they are recruited to the division site in the following conditional order: FtsZ, FtsA, FtsK, FtsQ, FtsL/FtsB, FtsW and FtsI (Errington, 2001; Buddelmeijer and Beckwith, 2002). The nomenclature of these proteins is derived from the filamentous phenotype adopted by temperature sensitive mutants that cannot divide at restrictive temperature. The first recruit to the division site, FtsZ, is a cytoplasmic protein that polymerizes in a ring-like structure (Addinall and Holland, 2002). Constriction of the FtsZ-ring has been proposed to drive the division process, in particular the membrane invagination. The last protein recruited to the site of division is FtsI, which is a class B PBP involved in septal peptidoglycan synthesis (Botta and Park, 1981). The localization of FtsI to the division site depends on FtsZ and the other intervening Fts proteins. However, some peptidoglycan synthesis that is independent of FtsI is observed at the division site of *E. coli*. This FtsI-independent but division-specific synthesis of peptidoglycan depends on the formation of the FtsZ-ring, but is independent of the other Fts proteins (de Pedro *et al.*, 1997).

Although peptidoglycan synthesis requires glycosyltransferase activity, the respective role of the different

Accepted 8 August, 2003. \*For correspondence. E-mail thierry.vernet@ibs.fr; Tel. (+33) 4 38 78 96 81; Fax (+33) 4 38 78 54 94.



ACADEMIC  
PRESS

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SCIENCE @ DIRECT®

Protein Expression and Purification 30 (2003) 18–25

Protein  
Expression  
& Purification

[www.elsevier.com/locate/yprep](http://www.elsevier.com/locate/yprep)

## Expression and purification of FtsW and RodA from *Streptococcus pneumoniae*, two membrane proteins involved in cell division and cell growth, respectively

Marjolaine Noirclerc-Savoie, Cécile Morlot, Philippe Gérard,<sup>1</sup>  
Thierry Vernet,\* and André Zapun

Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules, Institut de Biologie Structurale J.-P. Ebel (CEA/CNRS/UJF), 41 rue Jules Horowitz,  
38027 Grenoble Cedex 1, France

Received 4 November 2002, and in revised form 20 January 2003

### Abstract

FtsW and RodA are homologous integral membrane proteins involved in bacterial cell division and cell growth, respectively. Both proteins from *Streptococcus pneumoniae* were overexpressed in *Escherichia coli* as N-terminal His-tagged fusions. Their membrane addressing in *E. coli* was demonstrated by cell fractionation and was confirmed for FtsW by immunolocalization. Recombinant FtsW and RodA were solubilized from membranes using 3-(laurylamido)-*N,N'*-dimethylaminopropylamine oxide (LAPAO). The detergent was exchanged to polyoxyethylene 8 lauryl ether (C12E8) during one-step purification procedure by Co<sup>2+</sup>-affinity chromatography. This procedure yielded 50–150 µg protein per litre of culture. Both proteins are likely to be folded as they are resistant to trypsin digestion and could be incorporated into reconstituted lipid vesicles.

© 2003 Elsevier Science (USA). All rights reserved.

FtsW and RodA, which were first identified in *Escherichia coli*, as well as SpoVE in *Bacillus subtilis*, [1,2] constitute a family of polytopic membrane proteins termed SEDS<sup>2</sup> for shape, elongation, division, and sporulation [3]. SEDS are present in all bacteria that have a peptidoglycan cell wall [1–3]. Each SEDS appears to be functionally associated with a single class B penicillin-binding protein (PBP) [4]. Class B PBPs are transpeptidases involved in cell-wall synthesis by cross-

linking glycan strands through their peptide linkers [5,6]. One such pair is RodA and PBP2 in *E. coli*, which are both required for cell elongation and shape determination [7–9]. RodA and PBP2 are encoded in the same operon and inactivation of either gene results in *E. coli* spherical cells [8,10]. Although the precise function of RodA remains to be identified, it is required for the functionality of PBP2 [11]. By analogy with RodA and PBP2, it has been suggested that FtsW may act in concert with PBP3 in cell division [1]. The genes encoding FtsW and PBP3 (FtsI) are cotranscribed and their inactivation blocks cell division without affecting cell elongation [12]. Interestingly, in all bacteria whose genome has been fully sequenced, an equivalent number of SEDS and class B PBPs are found. Most genomes encode two such pairs [13], but sometimes three as in *B. subtilis* or even four as in *Streptomyces coelicolor*. These two species have more than one type of cell division, including sporulation. *Streptococcus pyogenes* apparently contains only one SEDS and one class B PBP. FtsW is required for cell division and was shown to be localized at the septum in *E. coli* [14]. In *E. coli*, FtsW is

\* Corresponding author. Fax: +33-4-38-78-54-94.

E-mail address: [vernet@ibs.fr](mailto:vernet@ibs.fr) (T. Vernet).

<sup>1</sup> Present address: UR910, INRA Domaine de Vilvert, Jouy-en-Josas Cedex 78352, France.

<sup>2</sup> Abbreviations used: LAPAO, 3-(laurylamido)-*N,N'*-dimethylaminopropylamine oxide; C12E8, polyoxyethylene 8 lauryl ether; C12M, dodecyl maltoside; C8E5, octyl pentaoxyethylene; Triton X-100, octylphenolpoly(ethyleneglycolether)<sub>n</sub>; CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulphonate; CHAPSO, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulphonate; LDAO, dodecyl dimethylamine *N*-oxide; DOPC, 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; SEDS, shape, elongation, division, and sporulation proteins; PBP, penicillin-binding protein; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole.

# The D,D-carboxypeptidase PBP3 organizes the division process of *Streptococcus pneumoniae*

Cécile Morlot, Marjolaine Noirclerc-Savoie,  
André Zapun, Otto Dideberg and Thierry Vernet\*

Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules, Institut de Biologie Structurale J.-P. Ebel (CEA/CNRS/UJF, UMR 5075), 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1, France.

## Summary

Bacterial division requires the co-ordination of membrane invagination, driven by the constriction of the FtsZ-ring, and concomitant cell wall synthesis, performed by the high-molecular-weight penicillin-binding proteins (HMW PBPs). Using immunofluorescence techniques, we show in *Streptococcus pneumoniae* that this co-ordination requires PBP3, a D,D-carboxypeptidase that degrades the substrate of the HMW PBPs. In a mutant deprived of PBP3, the apparent rings of HMW PBPs and that of FtsZ are no longer co-localized. In wild-type cells, PBP3 is absent at the future division site and present over the rest of the cell surface, implying that the localization of the HMW PBPs at mid-cell depends on the availability of their substrate. FtsW, a putative translocase of the substrate of the PBPs, forms an apparent ring that is co-localized with the septal HMW PBPs throughout the cell cycle of wild-type cells. In particular, the constriction of the FtsW-ring occurs after that of the FtsZ-ring, with the same delay as the constriction of the septal PBP-rings. However, in the absence of PBP3, FtsW remains co-localized with FtsZ in contrast to the HMW PBPs. Our work reveals an unexpected complexity in the relationships between the division proteins. The consequences of the absence of PBP3 indicate that the peptidoglycan composition is central to the co-ordination of the division process.

## Introduction

Bacterial division is a complex and poorly understood process, which encompasses the segregation of chromosomes, the membrane invagination and final fusion event

and the concomitant synthesis of the septal cell wall. Genetic and localization experiments conducted mainly in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* have shown that a conserved set of proteins is recruited to the site of division in the following conditional order: FtsZ, FtsA, FtsK, FtsQ, FtsL/FtsB, FtsW and FtsI (Buddelmeijer and Beckwith, 2002; Errington *et al.*, 2003). These essential proteins are termed Fts, as thermosensitive mutants of *E. coli* in the corresponding genes do not divide and adopt a filamentous phenotype at restrictive temperature. FtsZ polymerizes at mid-cell on the inner side of the cytoplasmic membrane as a ring, the constriction of which is thought to drive membrane invagination (Addinall and Holland, 2002). FtsA binds to both FtsZ and the membrane and possibly mediates the interaction between them (Buddelmeijer and Beckwith, 2002; Errington *et al.*, 2003). FtsK is a membrane protein with a cytoplasmic domain that is involved in chromosome segregation (Buddelmeijer and Beckwith, 2002; Errington *et al.*, 2003) and possibly in membrane fusion (Sharp and Pogliano, 1999). FtsQ, FtsL and FtsB are bitopic membrane proteins of unknown function (Buddelmeijer and Beckwith, 2002; Errington *et al.*, 2003). FtsW has 10 transmembrane segments (Gérard *et al.*, 2002) and has been proposed to translocate the precursor of the peptidoglycan to the extracellular side of the membrane where it is incorporated in the cell wall by several penicillin-binding proteins (PBPs), including FtsI (Matsushashi *et al.*, 1990).

Although the Fts proteins are recruited in a conditional succession, several lines of evidence indicate that a complex comprising all the division proteins does not exist throughout the septation process. Indeed, immunolocalization of FtsZ and PBP2x (FtsI) during the cell cycle of *Streptococcus pneumoniae* has shown that constriction of the FtsZ-ring is well under way while PBP2x remains at the periphery of the septum (Morlot *et al.*, 2003). Similarly, in *B. subtilis*, the localization of PBP2B was found to span the whole cell diameter, whereas clear signs of membrane constriction were observed (Daniel *et al.*, 2000). These findings raise the question of how the processes of membrane invagination and septal cell wall formation are co-ordinated.

D,D-Carboxypeptidases are not essential and have not hitherto been considered as major participants of the division mechanism, although a mutant of *S. pneumoniae* (*dacA*) deficient in its single D,D-carboxypeptidase PBP3

Accepted 24 November, 2003. \*For correspondence. E-mail thierry.vernet@ibs.fr; Tel. (+33) 4 38 78 96 81; Fax (+33) 4 38 78 54 94.

# ***In vitro* reconstitution of a trimeric complex of DivIB, DivIC and FtsL, and their transient co-localization at the division site in *Streptococcus pneumoniae***

Marjolaine Noirclerc-Savoie,<sup>1</sup> Audrey Le Gouëllec,<sup>1</sup> Cécile Morlot,<sup>1</sup> Otto Dideberg,<sup>2</sup> Thierry Vernet<sup>1\*</sup> and André Zapun<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules and

<sup>2</sup>Laboratoire de Cristallographie Macromoléculaire, Institut de Biologie Structurale (CEA/CNRS UMR 5075/UJF), 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble, France.

## **Summary**

**DivIB, DivIC and FtsL are bacterial proteins essential for cell division, which show interdependencies for their stabilities and localization. We have reconstituted *in vitro* a trimeric complex consisting of the recombinant extracellular domains of the three proteins from *Streptococcus pneumoniae*. The extracellular domain of DivIB was found to associate with a heterodimer of those of DivIC and FtsL. The heterodimerization of DivIC and FtsL was artificially constrained by fusion with interacting coiled-coils. Immunofluorescence experiments showed that DivIC is always localized at mid-cell, in contrast to DivIB and FtsL, which are co-localized with DivIC only during septation. Taken together, our data suggest that assembly of the trimeric complex DivIB/DivIC/FtsL is regulated during the cell cycle through controlled formation of the DivIC/FtsL heterodimer.**

## **Introduction**

Cell division is a fundamental process of life that is still poorly understood in bacteria, even though all the key proteins involved are probably known. Eight conserved essential proteins are present in cell wall containing eubacteria: FtsZ, FtsA, FtsK, DivIB(FtsQ), FtsL, DivIC(FtsB), FtsW and FtsI. Several studies have shown dependencies between the division proteins for their recruitment at mid-cell, with some variation between the model organisms *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* (Buddelmeijer and Beckwith, 2002; Errington *et al.*, 2003). FtsZ polymerizes as a ring at the division site.

FtsA binds to FtsZ, and both proteins are thought to drive membrane invagination. FtsK is involved in the segregation of chromosomes (Aussel *et al.*, 2002), but certainly plays another function essential for division (Draper *et al.*, 1998). FtsI participates in cell wall synthesis (Pisabarro *et al.*, 1986), and so does probably FtsW (Errington *et al.*, 2003). In contrast, the role of DivIB(FtsQ), DivIC(FtsB) and FtsL is largely unknown. The Fts and Div nomenclature are derived from *E. coli* and *B. subtilis* studies, respectively (Buddelmeijer and Beckwith, 2002; Errington *et al.*, 2003). DivIC(FtsB) is also known as YgbQ in *E. coli* (Buddelmeijer *et al.*, 2002). Given the weak sequence similarity between the DivIB, DivIC and FtsQ, FtsB proteins and the differences in behaviour observed in *B. subtilis* and *E. coli*, the Fts nomenclature is used for Gram-negative bacteria, whereas Div names are applied to proteins from Gram-positive bacteria such as our model organism *Streptococcus pneumoniae*.

DivIB(FtsQ), DivIC(FtsB) and FtsL share similar topologies and display a short amino-terminal cytoplasmic domain, a transmembrane segment and a longer extracellular domain (Buddelmeijer and Beckwith, 2002; Errington *et al.*, 2003). In *B. subtilis*, the three proteins show codependence of their localization at the division site (Daniel *et al.*, 1998; Daniel and Errington, 2000; Katis *et al.*, 2000). In *E. coli*, FtsQ is localized to the division site in the absence of FtsL and FtsB (Chen *et al.*, 1999; Buddelmeijer *et al.*, 2002), whereas the presence of FtsL and FtsB at the division site is mutually dependent and requires FtsQ (Ghigo *et al.*, 1999; Buddelmeijer *et al.*, 2002). Furthermore, DivIC is degraded in the absence of FtsL in *B. subtilis* (Daniel *et al.*, 1998), which is itself an intrinsically unstable protein *in vivo* that is stabilized by DivIB (Daniel and Errington, 2000). Conversely in *E. coli*, FtsL is rapidly degraded in the absence of FtsB (Buddelmeijer *et al.*, 2002). Taken together, these findings suggest that these three proteins interact. However, no physical interaction that involves DivIB has been demonstrated yet, whereas there are conflicting reports regarding the heterodimerization of FtsL and DivIC from *B. subtilis* (Sievers and Errington, 2000; Robson *et al.*, 2002). The interaction of FtsQ, FtsL and FtsB has recently been established in *E. coli in vivo* by immunoprecipitation (Buddelmeijer and Beckwith, 2004). As the

Accepted 24 September, 2004. \*For correspondence. E-mail thierry.vernet@ibs.fr; Tel. (+33) 4 38 78 96 81; Fax (+33) 4 38 78 54 94.

## Crystal Structure of a Peptidoglycan Synthesis Regulatory Factor (PBP3) from *Streptococcus pneumoniae*\*

Received for publication, July 26, 2004, and in revised form, November 29, 2004  
Published, JBC Papers in Press, December 13, 2004, DOI 10.1074/jbc.M408446200

Cécile Morlot<sup>‡§</sup>, Lucile Pernot<sup>¶</sup>, Audrey Le Gouellec<sup>‡</sup>, Anne Marie Di Guilmi<sup>‡</sup>, Thierry Vernet<sup>‡</sup>, Otto Dideberg<sup>¶</sup>, and Andréa Dessen<sup>¶||</sup>

From the <sup>¶</sup>Laboratoire de Cristallographie Macromoléculaire and <sup>‡</sup>Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules, Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel (CNRS/CEA/UJF), 41 rue Jules Horowitz, Grenoble 38027, France

Penicillin-binding proteins (PBPs) are membrane-associated enzymes which perform critical functions in the bacterial cell division process. The single D-Ala<sub>2</sub>D-Ala<sub>2</sub>-carboxypeptidase in *Streptococcus pneumoniae*, PBP3, has been shown to play a key role in control of availability of the peptidoglycan substrate during cell growth. Here, we have biochemically characterized and solved the crystal structure of a soluble form of PBP3 to 2.8 Å resolution. PBP3 folds into an NH<sub>2</sub>-terminal, D,D-carboxypeptidase-like domain, and a COOH-terminal, elongated β-rich region. The carboxypeptidase domain harbors the classic signature of the penicilloyl serine transferase superfamily, in that it contains a central, five-stranded antiparallel β-sheet surrounded by α-helices. As in other carboxypeptidases, which are present in species whose peptidoglycan stem peptide has a lysine residue at the third position, PBP3 has a 14-residue insertion at the level of its omega loop, a feature that distinguishes it from carboxypeptidases from bacteria whose peptidoglycan harbors a diaminopimelate moiety at this position. PBP3 performs substrate acylation in a highly efficient manner ( $k_{cat}/K_m = 50,500 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), an event that may be linked to its central role in control of pneumococcal peptidoglycan reticulation. A model that places PBP3 poised vertically on the bacterial membrane suggests that its COOH-terminal region could act as a pedestal, placing the active site in proximity to the peptidoglycan and allowing the protein to “skid” on the surface of the membrane, trimming pentapeptides during the cell growth and division processes.

Bacterial division is a complex phenomenon that requires the coordination of diverse processes including chromosomal segregation, FtsZ ring-dependent membrane constriction, and cell wall synthesis at the site of septation. The latter process involves the polymerization of glycan chains and transpeptidation of pentapeptidic moieties within the structure of the peptidoglycan, a highly cross-linked mesh that is crucial for main-

taining bacterial shape and providing protection from osmotic shock and lysis (1). Both reactions are catalyzed by penicillin-binding proteins (PBPs),<sup>1</sup> membrane-associated molecules, which can be classified as high molecular mass (hmm; often bifunctional) and low molecular mass (lmm; monofunctional) and play key roles in the bacterial life cycle. The pathogenic bacterium *Streptococcus pneumoniae* offers a unique opportunity for the study of the relationship between cell division and cell wall synthesis, since it carries a relatively simple set of six PBPs, compared with other well studied organisms which present much higher complexity (2). In this organism, PBP1a, -1b, and -2a catalyze both glycosyltransfer and transpeptidation; PBP2b and -2x only catalyze the latter reaction, and PBP3, the single lmm PBP in *S. pneumoniae*, has been shown to act as a D-Ala<sub>2</sub>D-Ala<sub>2</sub> carboxypeptidase (3).

The central role of hmm PBPs in the cell growth and division processes has been recently confirmed through the study of their localization within the cell cycle through the employment of immunofluorescence techniques (4). In *S. pneumoniae*, the constriction of the FtsZ-ring is spatially coupled to PBP2x- and PBP1a-mediated septal peptidoglycan synthesis, with the former process preceding the latter by approximately 5 min (4). At the beginning of the cell cycle, PBP3 localizes throughout the whole bacterial surface but seems to be absent from the future division site (5). Since the D,D-carboxypeptidase activity of PBP3 removes the COOH-terminal D-alanine of the peptidoglycan pentapeptide side chains, its hemispheric localization implies that the cellular region neighboring the future division site will be the only one where full-length pentapeptides will be available as substrates for other PBPs. Interestingly, a mutant pneumococcal strain which lacks PBP3 displays abnormal morphology and exhibits multiple septa initiated at aberrant locations (6). Thus, it is likely that the availability of intact pentapeptidic substrates dictates the localization of the hmm PBPs. Therefore, by guaranteeing that pentapeptides are available uniquely at the future division site, PBP3 may ensure the spatial coordination of the FtsZ-ring with the septum synthesis machinery.

PBP3 is associated to the bacterial membrane through a COOH-terminal amphiphilic helix. In the D,D-carboxypeptidase reaction catalyzed by PBP3, an active serine residue reacts with the D-Ala-D-Ala COOH terminus of a peptide chain of the peptidoglycan to form a transient acyl-enzyme complex that is subsequently hydrolyzed. The reaction results in the formation of a tetrapeptide that can only serve as an acceptor for a subsequent transpeptidation reaction by other PBPs (3). As in

\* This work was supported in part by European Commission Grant LSHM-CT-2003-503335 (COBRA). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

The atomic coordinates and structure factors (code 1XP4) have been deposited in the Protein Data Bank, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, Rutgers University, New Brunswick, NJ (<http://www.rcsb.org/>).

§ Supported by a CFR fellowship from the Commissariat à l’Energie Atomique.

|| An EMBO Young Investigator. To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-4-38-78-95-90; Fax: 33-4-38-78-54-94; E-mail: [dessen@ibs.fr](mailto:dessen@ibs.fr).

<sup>1</sup> The abbreviations used are: PBP, penicillin-binding protein; hmm, high molecular mass; lmm, low molecular mass; D,D, D-Ala<sub>2</sub>D-Ala<sub>2</sub>; Ac<sub>2</sub>-KAA, N,N-diacetyl-L-Lys-D-Ala-D-Ala; SeMet, selenomethionine; r.m.s., root mean square.

Cecile Morlot,<sup>a</sup> Wieger  
Hemrika,<sup>b</sup> Roland A. Romijn,<sup>b</sup>  
Piet Gros,<sup>c</sup> Stephen Cusack<sup>a\*</sup>  
and Andrew A. McCarthy<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>European Molecular Biology Laboratory,  
6 Rue Jules Horowitz, BP 181, 38042 Grenoble,  
France, <sup>b</sup>ABC Expression Center, Utrecht  
University, Padualaan 8, 3584 CH Utrecht,  
The Netherlands, and <sup>c</sup>Department of Crystal  
and Structural Chemistry, Bijvoet Center for  
Biomolecular Research, Utrecht University,  
Padualaan 8, 3584 CH Utrecht,  
The Netherlands

Correspondence e-mail: cusack@embl.fr,  
andrewmc@embl.fr

Received 18 May 2007  
Accepted 6 July 2007

## Cloning, expression, crystallization and preliminary X-ray analysis of the first two Ig domains from human Roundabout 1 (Robo1)

Activation of Roundabout 1 (Robo1) by Slit proteins results in axon repulsion from the midline. Robo1 is a large transmembrane receptor expressed on the axon growth cone and the minimal Robo1-binding region required for Slit activation has been mapped to the N-terminal Ig1–2 domains. The cDNA encoding the first two Ig domains of Robo1 has been cloned and the protein has been expressed in HEK293 EBNA-1 mammalian cells. Here, the purification and crystallization conditions of this Robo1 construct are reported. The crystals are orthorhombic, space group  $P2_12_12$ , with unit-cell parameters  $a = 38.8$ ,  $b = 69.4$ ,  $c = 103.3$  Å and one molecule in the asymmetric unit. X-ray diffraction data have been collected to 2.8 Å resolution on beamline ID29 at the ESRF.

### 1. Introduction

Bilaterally symmetric nervous systems are divided into left and right mirror images by the midline and communicate *via* the commissural subset of axons. Developing axons navigate through the embryo by processing a number of different signals in their immediate environment (Tessier-Lavigne & Goodman, 1996) and the midline provides such target signals for migrating commissural neurons (Garbe & Bashaw, 2004). Commissural neurons are initially attracted and allowed to cross the midline by activation of the Deleted in Colorectal Cancer (DCC) receptor upon binding the midline-secreted attractant netrin (Stein & Tessier-Lavigne, 2001). Upon midline crossing, the commissural axons must not recross and this repulsion is mediated by activation of the Roundabout (Robo) receptor upon binding of the midline-secreted repellent Slit (Brose *et al.*, 1999). The Robo receptors are large multidomain transmembrane receptors expressed on the axonal growth cones (Kidd *et al.*, 1998). Four Robo genes have been identified in mammals: *Robo1*, *Robo2*, *Robo3* (or *Rig-1*) and *Robo4* (or *Magic Roundabout*) (Huminiecki *et al.*, 2002). All the Robo receptors, with the exception of Robo4, share a common domain architecture containing five immunoglobulin domains (Ig), three fibronectin III (FN3) domains, a transmembrane domain and an intracellular tail. The exception, Robo4, is specifically expressed in the vascular endothelium and contains only two Ig and two FN3 extracellular domains (Park *et al.*, 2003).

Various combinations of Robo1, Robo2 and Robo3 expression on a given neuron in *Drosophila* are important for the lateral position these neurons take relative to the midline (Rajagopalan *et al.*, 2000). While the exact details of this so-called 'Robo-code' are still under investigation, it is thought to be mediated by a Slit concentration gradient that spreads out laterally from the midline (Simpson *et al.*, 2000). A similar, though perhaps more complex, expression pattern of Robo1 and Robo2 has also been observed in vertebrates (Long *et al.*, 2004). Recent studies have also shown that Robo3 can act as a negative regulator of Slit–Robo signalling (Sabatier *et al.*, 2004). These data suggest that Robo3 has an important role in sequestering Robo1 by an unknown mechanism, allowing the commissural neurons to cross the midline. This mechanism appears to be quite different to that played by *commissureless* (*comm*) in *Drosophila*, which down-regulates Robo at the intracellular trafficking level to achieve the same effect (Keleman *et al.*, 2002). The most sequence-



© 2007 International Union of Crystallography  
All rights reserved

# Production of Slit2 LRR domains in mammalian cells for structural studies and the structure of human Slit2 domain 3

Cecile Morlot,<sup>a</sup> Wieger Hemrika,<sup>b</sup> Roland A. Romijn,<sup>b</sup> Piet Gros,<sup>c</sup> Stephen Cusack<sup>a\*</sup> and Andrew A. McCarthy<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>European Molecular Biology Laboratory, 6 Rue Jules Horowitz, BP 181, 38042 Grenoble, France, <sup>b</sup>ABC Expression Center, Utrecht University, Padualaan 8, 3584 CH Utrecht, The Netherlands, and <sup>c</sup>Department of Crystal and Structural Chemistry, Bijvoet Center for Biomolecular Research, Utrecht University, Padualaan 8, 3584 CH Utrecht, The Netherlands

Correspondence e-mail: cusack@embl.fr, andrewmc@embl.fr

Slit2 and Roundabout 1 (Robo1) provide a key ligand–receptor interaction for the navigation of commissural neurons during the development of the central nervous system. Slit2 is a large multidomain protein containing an unusual domain organization of four tandem leucine-rich repeat (LRR) domains at its N-terminus. These domains are well known to mediate protein–protein interactions; indeed, the Robo1-binding region has been mapped to the concave face of the second LRR domain. It has also been shown that the fourth LRR domain may mediate Slit dimerization and that both the first and second domains can bind heparin. Thus, while roles have been ascribed for three of the LRR domains, there is still no known role for the third domain. Each of the four LRR domains from human Slit2 have now been successfully expressed in milligram quantities using expression in mammalian cells. Here, the crystallization of the second and third LRR domains and the structure of the third LRR domain are presented. This is the first structure of an LRR domain from human Slit2, which has an extra repeat compared with the *Drosophila* homologue. It is proposed that a highly conserved patch of surface residues on the concave face may mediate any protein–protein interactions involving this LRR domain, a result that will be useful in guiding further studies on Slit2.

Received 30 April 2007

Accepted 19 July 2007

**PDB Reference:** third LRR domain of human Slit2, 2v70, r2v70sf.

## 1. Introduction

Axons are known to travel long distances and follow specific pathways to ultimately reach their correct targets during embryonic development. They are able to achieve this remarkable feat by simplifying the complex pathway into a smaller number of intermediate steps or choice points (Tessier-Lavigne & Goodman, 1996). One such choice point occurs at the midline, where commissural axons turn longitudinally into specific lateral pathways. They do this by processing a number of different signals emanating from the midline (Garbe & Bashaw, 2004). Slit and Roundabout (Robo) provide one of the key ligand–receptor interactions that mediate this important choice point (for a recent review, see Dickson & Gilestro, 2006). Slit and Robo are highly conserved from fruit flies to mammals, but while *Drosophila* has a single Slit and three Robos, mammals have three Slit proteins (Slit1, Slit2 and Slit3; Brose *et al.*, 1999) and four Robos (Robo1, Robo2, Robo3 or Rig-I and Robo4 or Magic Roundabout; Huminiecki *et al.*, 2002). Slit–Robo signalling is also implicated in vascularization (Carmeliet & Tessier-Lavigne, 2005) and cancer (Ito *et al.*, 2006; Prasad *et al.*, 2004).

The Slit proteins are large multidomain proteins secreted by the glial cells at the midline (Rothberg *et al.*, 1990). All the slit proteins share a common domain architecture containing four

# Structural insights into the Slit-Robo complex

Cecile Morlot\*, Nicole M. Thielens<sup>†</sup>, Raimond B. G. Ravelli\*, Wieger Hemrika<sup>‡</sup>, Roland A. Romijn<sup>‡</sup>, Piet Gros<sup>§</sup>, Stephen Cusack\*, and Andrew A. McCarthy\*<sup>¶1</sup>

\*European Molecular Biology Laboratory, 6 Rue Jules Horowitz, BP 181, 38042 Grenoble, France; <sup>†</sup>Laboratoire d'Enzymologie Moléculaire, Institut de Biologie Structurale J. P. Ebel, 38027 Grenoble Cedex 1, France; and <sup>‡</sup>ABC Expression Center and <sup>§</sup>Department of Crystal and Structural Chemistry, Bijvoet Center for Biomolecular Research, Utrecht University, Padualaan 8, 3584 CH Utrecht, The Netherlands

Edited by Corey S. Goodman, Renovis, South San Francisco, CA, and approved August 7, 2007 (received for review June 6, 2007)

**Slits are large multidomain leucine-rich repeat (LRR)-containing proteins that provide crucial guidance cues in neuronal and vascular development. More recently, Slits have been implicated in heart morphogenesis, angiogenesis, and tumor metastasis. Slits are ligands for the Robo (Roundabout) receptors, which belong to the Ig superfamily of transmembrane signaling molecules. The Slit-Robo interaction is mediated by the second LRR domain of Slit and the two N-terminal Ig domains of Robo, but the molecular details of this interaction and how it induces signaling remain unclear. Here we describe the crystal structures of the second LRR domain of human Slit2 (Slit2 D2), the first two Ig domains of its receptor Robo1 (Ig1–2), and the minimal complex between these proteins (Slit2 D2-Robo1 Ig1). Slit2 D2 binds with its concave surface to the side of Ig1 with electrostatic and hydrophobic contact regions mediated by residues that are conserved in other family members. Surface plasmon resonance experiments and a mutational analysis of the interface confirm that Ig1 is the primary domain for binding Slit2. These structures provide molecular insight into Slit-Robo complex formation and will be important for the development of novel cancer therapeutics.**

guidance cues | neurons | signaling

**B**ilaterally symmetric nervous systems, such as those of insects and vertebrates, possess a special midline structure that establishes a partition between the left and right mirror-image halves. To connect and coordinate both sides, a subset of so-called commissural axons has to cross the midline. Developing commissural axons navigate through the embryo by processing and responding to a number of different signals in their immediate environment. Both Slit and Netrin and their receptors, Roundabout (Robo) and Deleted in Colorectal Carcinoma (DCC), provide key ligand–receptor interactions for this process during neuronal development, especially at the midline of the central nervous system of vertebrates and invertebrates (1, 2). The Slit-Robo signaling complex is also central to the development of blood vessels (3, 4) and some organs, for example, the heart (5, 6). In addition, Slit2 has been implicated in breast cancer metastasis (7) and Robo1 in hepatocellular carcinoma (8).

Three Slit proteins (Slit1–3) (9) and four Robo proteins (Robo1, Robo2, Robo3/Rig-1, and the vascular-specific Robo4/magic Roundabout) (10–12) have been identified in mammals. Netrin and Slit1–3 are secreted by the midline cells, whereas DCC and Robo1–3 are expressed on the surface of growing axons (2). During neuronal development, the commissural axons are initially attracted to the midline through a Netrin–DCC-mediated interaction (2). This attractive signal is subsequently silenced near the midline to allow crossing through a Slit-mediated interaction between DCC and Robo (13). Slit-Robo signaling then induces repulsion, expelling the axons from the midline and preventing recrossing (1). In vertebrates, Robo3 is also proposed to have a role in midline crossing by antagonizing Robo1 (14). The exact details of this mechanism remain unknown, but two Robo3 isoforms (Robo3A and Robo3B) that differ only at their N terminus by alternative splicing have recently been identified (15). These studies show that, although the Robo3A isoform is unable to bind Slit2, it can still form

heterophilic interactions with Robo1. This raises the possibility that Robo3 may, in fact, sequester Robo1 into an inactive receptor complex on the developing axon to allow midline crossing (15).

Slit proteins contain a unique N-terminal tandem of four leucine-rich repeat (LRR) domains (D1–D4) followed by seven to nine EGF-like domains, a laminin G domain and a C-terminal cysteine-rich module (16). Proteolytic cleavage within the EGF region releases the active N-terminal fragment (17). The ectodomain of Robo1–3 consists of five Ig-like (Ig1–Ig5) and three type III fibronectin domains (18), whereas Robo4 has only two Ig domains. Slits1–3 cross-interact with Robo1–3 via their second LRR domain and first two Ig domains, respectively (19, 20). However, the binding partner(s) for Robo4 still remains unclear. Heparin has also been observed to bind Slit2 and is proposed to form an integral component of the Slit-Robo signaling complex (21). The crystal structure of the third LRR domain of *Drosophila* Slit (dSlit D3) has been determined (20), and elsewhere, we describe the crystal structure of the equivalent domain of Slit2 (Slit2 D3) (22), which has one more LRR than dSlit D3. To help elucidate the exact molecular basis of Slit-Robo signaling, we biochemically characterized and determined the structures of the separate interacting domains of human Robo1 and Slit2, as well as the minimal complex between them. These studies reveal that Ig1 of Robo1 is the primary interaction domain for Slit2, and that the bipartite interaction region involves highly conserved residues from both proteins.

## Results

**Structure of Robo1 Ig1-2.** The crystal structure of the first two Ig domains from human Robo1 was determined at 2.5-Å resolution by using the multiple wavelength anomalous diffraction technique from a single mercury derivative (Table 1). Both domains have the canonical I1  $\beta$ -sandwich fold formed by two antiparallel  $\beta$ -sheets containing strands ABB'ED and strands A'GG'FCC' and an internal disulfide bridge connecting  $\beta$ F to the linker between  $\beta$ B and  $\beta$ B' (23) (Fig. 1A). The closest structural neighbors to Ig1 and Ig2 are the Ig domains 1 and 4, respectively, of the chicken neural axonin-1 (24) (rmsd<sub>92C $\alpha$</sub>  = 1.1 Å and rmsd<sub>89C $\alpha$</sub>  = 1.5 Å). There is essentially no polypeptide linker between the two domains, the final strand of Ig1 ( $\beta$ G') being

Author contributions: C.M., S.C., and A.A.M. designed research; C.M., N.M.T., R.B.G.R., W.H., R.A.R., and A.A.M. performed research; W.H., R.A.R., and P.G. contributed new reagents/analytic tools; C.M., N.M.T., S.C., and A.A.M. analyzed data; and C.M., S.C., and A.A.M. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Freely available online through the PNAS open access option.

Abbreviations: SPR, surface plasmon resonance; LRR, leucine-rich repeat.

Data deposition: The atomic coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank, www.pdb.org [PDB ID codes 2v9q (Robo1 Ig1-2; crystal form 1), 2v9r (Robo1 Ig1-2; crystal form 2), 2v9s (Slit2 D2), and 2v9t (Slit2 D2-Robo1 Ig1)].

<sup>¶1</sup>To whom correspondence should be addressed. E-mail: andrewmc@embl.fr.

This article contains supporting information online at [www.pnas.org/cgi/content/full/0705310104/DC1](http://www.pnas.org/cgi/content/full/0705310104/DC1).

© 2007 by The National Academy of Sciences of the USA

# Novel Secretion Apparatus Maintains Spore Integrity and Developmental Gene Expression in *Bacillus subtilis*

Thierry Doan<sup>1</sup>\*, Cecile Morlot<sup>1</sup>\*, Jeffrey Meisner<sup>2</sup>, Monica Serrano<sup>3</sup>, Adriano O. Henriques<sup>3</sup>, Charles P. Moran, Jr.<sup>2</sup>, David Z. Rudner<sup>1\*</sup>

**1** Department of Microbiology and Molecular Genetics, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, United States of America, **2** Department of Microbiology and Immunology, Emory University School of Medicine, Atlanta, Georgia, United States of America, **3** Microbial Development Group, Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa, Oeiras, Portugal

## Abstract

Sporulation in *Bacillus subtilis* involves two cells that follow separate but coordinately regulated developmental programs. Late in sporulation, the developing spore (the forespore) resides within a mother cell. The regulation of the forespore transcription factor  $\sigma^G$  that acts at this stage has remained enigmatic.  $\sigma^G$  activity requires eight mother-cell proteins encoded in the *spoIIIA* operon and the forespore protein SpoIIQ. Several of the SpoIIIA proteins share similarity with components of specialized secretion systems. One of them resembles a secretion ATPase and we demonstrate that the ATPase motifs are required for  $\sigma^G$  activity. We further show that the SpoIIIA proteins and SpoIIQ reside in a multimeric complex that spans the two membranes surrounding the forespore. Finally, we have discovered that these proteins are all required to maintain forespore integrity. In their absence, the forespore develops large invaginations and collapses. Importantly, maintenance of forespore integrity does not require  $\sigma^G$ . These results support a model in which the SpoIIIA-SpoIIQ proteins form a novel secretion apparatus that allows the mother cell to nurture the forespore, thereby maintaining forespore physiology and  $\sigma^G$  activity during spore maturation.

**Citation:** Doan T, Morlot C, Meisner J, Serrano M, Henriques AO, et al. (2009) Novel Secretion Apparatus Maintains Spore Integrity and Developmental Gene Expression in *Bacillus subtilis*. PLoS Genet 5(7): e1000566. doi:10.1371/journal.pgen.1000566

**Editor:** Gregory P. Copenhaver, The University of North Carolina at Chapel Hill, United States of America

**Received:** April 9, 2009; **Accepted:** June 18, 2009; **Published:** July 17, 2009

**Copyright:** © 2009 Doan et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported in part by National Institutes of Health Grant GM073831-01A1 and the Giovanni Armenise-Harvard Foundation (DZR), GM0054395 (CM), Grant POCI/BIA-BCM/60855/2004 from “Fundação para a Ciência e a Tecnologia” (FCT) (AOH). DZR is a Damon Runyon Scholar supported by the Damon Runyon Cancer Research Foundation (DRS-44-05). MS holds a post-doctoral fellowship (SFRH/BPD/36328/2007) from the FCT. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: rudner@hms.harvard.edu

† These authors contributed equally to this work.

## Introduction

How cells communicate with each other is a fundamental biological question relevant to the development of multi-cellular organisms, microbial pathogenesis and communities of microorganisms. In the bacterium *Bacillus subtilis*, cell-cell signaling pathways play a key role in coordinating gene expression during the process of spore formation. Upon the initiation of sporulation, the developing cell divides asymmetrically, generating two cells of unequal size and dissimilar fate: a small cell (the prospective spore), referred to as the forespore, and a large cell called the mother cell [1,2]. Initially, these two cells lie side by side, but shortly after polar division the mother cell membranes migrate around the forespore in a phagocytic-like process, generating a cell within a cell. As a result of this engulfment process, the forespore is surrounded by two membranes, one derived from the mother cell, the other from the forespore. Shortly after the completion of engulfment, the mother cell packages the forespore in a protective coat while the forespore prepares for dormancy. Once the spore is fully mature, the mother cell lyses releasing it into the environment.

During this developmental process, the mother cell and forespore follow separate programs of gene expression directed by alternative sigma factors. However, cell-cell signaling pathways

ensure that gene expression in one cell is coordinated with gene expression in the other [2–4]. Shortly after polar division, the first cell-type specific transcription factor ( $\sigma^F$ ) is activated in the forespore.  $\sigma^F$  is then responsible for the activation of  $\sigma^E$  in the mother cell. At a later stage,  $\sigma^E$  is required for the activation of  $\sigma^G$  in the forespore. Finally,  $\sigma^G$  sets in motion the activation of  $\sigma^K$  in the mother cell. The signal transduction pathways that govern the activation of the mother-cell transcription factors ( $\sigma^E$  and  $\sigma^K$ ) are well established [1,2,5]. By contrast, the mechanism underlying activation of  $\sigma^G$  in the forespore has remained enigmatic.

The late-acting forespore transcription factor  $\sigma^G$  appears to be regulated at multiple levels. First, the transcription of the gene encoding  $\sigma^G$  (*sigG*) is under the control of the earlier-acting forespore transcription factor  $\sigma^F$  [6,7]. However, unlike the other  $\sigma^F$ -dependent genes, *sigG* transcription is delayed by approximately 30 min by an as yet unknown mechanism [8–10]. Once synthesized,  $\sigma^G$  activity requires eight mother cell proteins encoded in the *spoIIIA* operon [11] and a forespore membrane protein SpoIIQ [12]. In addition,  $\sigma^G$  activity requires proper engulfment. Mutants that block the engulfment process are impaired in  $\sigma^G$ -dependent gene expression [13–15]. Finally, once activated,  $\sigma^G$  recognizes its own promoter and its level increases rapidly in the forespore [6,7].

# A highly coordinated cell wall degradation machine governs spore morphogenesis in *Bacillus subtilis*

Cecile Morlot,<sup>1</sup> Tsuyoshi Uehara,<sup>1</sup> Kathleen A. Marquis, Thomas G. Bernhardt,<sup>3</sup> and David Z. Rudner<sup>2</sup>

Department of Microbiology and Molecular Genetics, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115, USA

**How proteins catalyze morphogenesis is an outstanding question in developmental biology. In bacteria, morphogenesis is intimately linked to remodeling the cell wall exoskeleton. Here, we investigate the mechanisms by which the mother cell engulfs the prospective spore during sporulation in *Bacillus subtilis*. A membrane-anchored protein complex containing two cell wall hydrolases plays a central role in this morphological process. We demonstrate that one of the proteins (SpoIIP) has both amidase and endopeptidase activities, such that it removes the stem peptides from the cell wall and cleaves the cross-links between them. We further show that the other protein (SpoIID) is the founding member of a new family of lytic transglycosylases that degrades the glycan strands of the peptidoglycan into disaccharide units. Importantly, we show that SpoIID binds the cell wall, but will only cleave the glycan strands after the stem peptides have been removed. Finally, we demonstrate that SpoIID also functions as an enhancer of SpoIIP activity. Thus, this membrane-anchored enzyme complex is endowed with complementary, sequential, and stimulatory activities. These activities provide a mechanism for processive cell wall degradation, supporting a model in which circumferentially distributed degradation machines function as motors pulling the mother cell membranes around the forespore.**

[*Keywords:* Morphogenesis; cell shape; peptidoglycan; sporulation; amidase; lytic transglycosylase]

Supplemental material is available at <http://www.genesdev.org>.

Received October 24, 2009; revised version accepted December 15, 2009.

How enzyme complexes orchestrate morphogenic transitions is a fundamental yet poorly understood issue in developmental biology. In eukaryotes, cytoskeletal elements like actin play key roles in controlling changes in cell shape during growth and development (Insall and Machesky 2009). In bacteria, analogous proteins have been implicated in morphogenesis (den Blaauwen et al. 2008). However, since bacteria are encased in an exoskeleton (the cell wall), changes in cell shape ultimately require remodeling of the wall material that surrounds them. The cell wall or peptidoglycan (PG) layer is composed of long glycan chains with repeating units of *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) and *N*-acetylmuramic acid (MurNAc) linked by glycosidic bonds (Fig. 1B). Attached to the MurNAc sugar is a short peptide that is used to form cross-links between adjacent glycan strands, generating a continuous three-dimensional (3D) meshwork that envelops the bacterium. To remodel this cell-shaped mesh, often referred to as the murein or PG sacculus,

enzymes capable of breaking PG linkages are needed. Most bacteria encode a suite of these enzymes, and, in general, every amide and glycosidic linkage in PG is subject to cleavage by at least one family of enzymes that exists in nature (Firczuk and Bochtler 2007; Vollmer et al. 2008).

The process of sporulation in the bacterium *Bacillus subtilis* provides a simple and experimentally tractable system in which to study morphogenesis and cell wall remodeling. Upon starvation, *B. subtilis* differentiates into a dormant cell type called a spore (Stragier and Losick 1996; Errington 2003). The first landmark event in this process is the formation of an asymmetric septum that divides the cell into two unequal-sized compartments: a large cell (called the mother cell) and a small cell (the prospective spore, or forespore). Shortly after polar division, the mother cell membranes migrate around the forespore in a phagocytic-like process, generating a cell within a cell. This morphological process is called engulfment and is the subject of this investigation. Upon the completion of engulfment, the mother nurtures the spore and packages it in a protective coat while the forespore prepares for dormancy. Upon spore maturation, the mother cell lyses, releasing it into the environment.

<sup>1</sup>These authors contributed equally to this work.

Corresponding authors.

<sup>2</sup>E-MAIL [rudner@hms.harvard.edu](mailto:rudner@hms.harvard.edu); FAX (617) 738-7664.

<sup>3</sup>E-MAIL [thomas@hms.harvard.edu](mailto:thomas@hms.harvard.edu); FAX (617) 738-7664.

Article is online at <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.1878110>.

# Interaction of Penicillin-Binding Protein 2x and Ser/Thr protein kinase StkP, two key players in *Streptococcus pneumoniae* R6 morphogenesis

C. Morlot,<sup>1,2,3†</sup> L. Bayle,<sup>1,2,3†</sup> M. Jacq,<sup>1,2,3</sup> A. Fleurie,<sup>4</sup>  
G. Tourcier,<sup>1,2,3</sup> F. Galisson,<sup>4</sup> T. Vernet,<sup>1,2,3</sup>  
C. Grangeasse<sup>4\*\*</sup> and A. M. Di Guilmi<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Univ. Grenoble Alpes, IBS, F-38027 Grenoble, France.

<sup>2</sup>CNRS, IBS, F-38027 Grenoble, France.

<sup>3</sup>CEA, IBS, Institut de Biologie Structurale, Pneumococcus Group, F-38027 Grenoble France.

<sup>4</sup>Bases Moléculaires et Structurales des Systèmes Infectieux, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Université Lyon 1, CNRS, Université de Lyon, UMR 5086, 7 passage du Vercors, 69367 Lyon, France.

## Summary

**Bacterial cell growth and division require the co-ordinated action of peptidoglycan biosynthetic enzymes and cell morphogenesis proteins. However, the regulatory mechanisms that allow generating proper bacterial shape and thus preserving cell integrity remain largely uncharacterized, especially in ovoid cocci. Recently, the conserved eukaryotic-like Ser/Thr protein kinase of *Streptococcus pneumoniae* (StkP) was demonstrated to play a major role in cell shape and division. Here, we investigate the molecular mechanisms underlying the regulatory function(s) of StkP and show that it involves one of the essential actors of septal peptidoglycan synthesis, Penicillin-Binding Protein 2x (PBP2x). We demonstrate that StkP and PBP2x interact directly and are present in the same membrane-associated complex in *S. pneumoniae*. We further show that they both display a late-division localization pattern at the division site and that the positioning of PBP2x depends on the presence of the extracellular PASTA domains of StkP. We demonstrate that StkP and PBP2x interaction is mediated by their extracellular regions and that the complex formation is inhibited *in vitro* in the presence of cell wall fragments. These data suggest that the role**

**of StkP in cell division is modulated by an interaction with PBP2x.**

## Introduction

The bacterial cell wall, which determines the shape of bacteria, is remodelled during essential processes like cell division and elongation, but also in response to environmental alterations like sporulation or assembly of surface-exposed pili and flagella. Remodelling of the cell wall is performed by localized multi-membrane protein complexes that co-ordinate peptidoglycan (PG) synthetic and degrading activities. The shape of the ovoid *Streptococcus pneumoniae* is likely to result from septal and peripheral PG assembly performed by specific morphogenetic machineries (Land and Winkler, 2011; Fleurie *et al.*, 2012). By analogy with the composition of complexes involved in cell elongation and division of rod-shape *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* (Errington *et al.*, 2003; Goehring and Beckwith, 2005; Zapun *et al.*, 2008; Sham *et al.*, 2012), it has been proposed that the septal machinery in *S. pneumoniae* would include FtsZ, EzrA, GpsB, the FtsW flippase (Mohammadi *et al.*, 2011), the heterotrimer DivIB/FtsL/DivIC (Noirclerc-Savoye *et al.*, 2005; Le Gouëllec *et al.*, 2008) and the monofunctional Penicillin-Binding Protein (PBP) PBP2x (Morlot *et al.*, 2003). On the other hand, the peripheral machinery would be formed by MreC, MreD, RodA, GpsB and PBP2b (Land and Winkler, 2011; Zapun *et al.*, 2008). *S. pneumoniae* encodes five high-molecular-weight PBPs required for PG biosynthesis. Three of them (PBP1a, PBP1b and PBP2a) possess glycosyltransferase and transpeptidase domains whereas the other two, PBP2x and PBP2b only harbour a transpeptidase domain. The function of each PBP in PG biosynthesis and morphogenesis remains largely unknown and a glycosyltransferase activity has only been demonstrated for PBP2a (Di Guilmi *et al.*, 2003; Helassa *et al.*, 2012). The role of PBP2x in cell division arose from the observation that *pbp2x* gene is essential and located in a cluster devoted to division (Kell *et al.*, 1993; Massidda *et al.*, 1998). In addition, PBP2x localizes to the septum in *S. pneumoniae* (Morlot *et al.*, 2003) and specific inhibition of the transpeptidase activity of *Lactococcus lactis* PBP2x

Accepted 27 July, 2013. For correspondence. \*E-mail anne-marie.di-guilmi@ibs.fr; Tel. (+33) 4 38 78 56 34; Fax (+33) 4 38 78 55 94; \*\*E-mail c.grangeasse@ibcp.fr; Tel. (+33) 4 72 72 26 88; Fax (+33) 4 72 72 26 41. †Both authors contributed equally to this work.

# Structure–function analysis of the LytM domain of EnvC, an activator of cell wall remodelling at the *Escherichia coli* division site

Nick T. Peters,<sup>1†</sup> Cécile Morlot,<sup>2,3,4\*\*\*†</sup>  
Desirée C. Yang,<sup>1</sup> Tsuyoshi Uehara,<sup>1</sup>  
Thierry Vernet<sup>2,3,4</sup> and Thomas G. Bernhardt<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology and Immunobiology, Harvard Medical School, 200 Longwood Avenue, Boston, MA 02115, USA.

<sup>2</sup>CEA, <sup>3</sup>CNRS and <sup>4</sup>Université Joseph Fourier-Grenoble1, Pneumococcus Group, Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, 41 Rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble cedex 1, France.

## Summary

**Proteins with LytM (Peptidase\_M23) domains are broadly distributed in bacteria and have been implicated in a variety of important processes, including cell division and cell-shape determination. Most LytM-like proteins that have been structurally and/or biochemically characterized are metallo-endopeptidases that cleave cross-links in the peptidoglycan (PG) cell wall matrix. Notable exceptions are the *Escherichia coli* cell division proteins EnvC and NlpD. These LytM factors are not hydrolases themselves, but instead serve as activators that stimulate PG cleavage by target enzymes called amidases to promote cell separation. Here we report the structure of the LytM domain from EnvC, the first structure of a LytM factor implicated in the regulation of PG hydrolysis. As expected, the fold is highly similar to that of other LytM proteins. However, consistent with its role as a regulator, the active-site region is degenerate and lacks a catalytic metal ion. Importantly, genetic analysis indicates that residues in and around this degenerate active site are critical for amidase activation *in vivo* and *in vitro*. Thus, in the regulatory LytM factors, the apparent substrate binding pocket conserved in active metallo-endopeptidases has been adapted to control PG hydrolysis by another set of enzymes.**

Accepted 19 June, 2013. For correspondence. \*E-mail thomas\_bernhardt@hms.harvard.edu; Tel. (+1) 617 432 6971; Fax (+1) 617 738 7664; \*\*E-mail cecile.morlot@ibs.fr; Tel. (+33) 4 38 78 92 03; Fax (+33) 4 38 78 55 94. †These authors contributed equally to this work.

## Introduction

Most bacteria surround themselves with a polysaccharide cell wall matrix called peptidoglycan (PG). This meshwork is essential for cellular integrity and is composed of glycan strands connected to one another by cross-links between attached peptides (Typas *et al.*, 2012). New PG material is synthesized by the high-molecular-weight penicillin-binding proteins (HMW-PBPs) (Typas *et al.*, 2012). However, because the PG layer is a continuous molecule, enzymes that cleave bonds in the PG network, referred to as PG hydrolases or autolysins, are also required for the expansion and division of the matrix (Uehara and Bernhardt, 2011; Hashimoto *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2012; Typas *et al.*, 2012).

Over the years, an incredibly diverse collection of enzymes with PG hydrolase activity have been identified. Every glycosidic or amide linkage in PG is a substrate for cleavage, and at least one, but often several distinct families of enzymes, are known to target individual bonds (Firczuk and Bochtler, 2007; Vollmer *et al.*, 2008; van Heijenoort, 2011). Moreover, most bacterial genomes appear to encode a large number of different PG hydrolases. For example, the model Gram-negative bacterium *Escherichia coli* encodes over 35 known or predicted PG hydrolases belonging to 12 different families (van Heijenoort, 2011). Importantly, however, our studies of the LytM-domain proteins in this organism indicate that at least some of the predicted PG hydrolases in bacterial genomes are likely to have developed alternative functions in addition to, or at the expense of, catalytic activity (Uehara *et al.*, 2010).

Proteins with LytM (Pfam: Peptidase\_M23) domains are broadly distributed in bacteria (Finn *et al.*, 2008). They are homologues of lysostaphin, a well-characterized zinc metallo-endopeptidase that cleaves the unique pentaglycine cross-links found in *Staphylococcus aureus* PG (Browder *et al.*, 1965). The protein family is named after LytM from *S. aureus* (<sup>Sa</sup>LytM), which was the first member to be structurally characterized (Firczuk *et al.*, 2005; Firczuk and Bochtler, 2007). Since the structure of LytM was described, members of the protein family from a diverse array of bacterial species have been implicated in

# Structural Evidence for a Two-Regime Photobleaching Mechanism in a Reversibly Switchable Fluorescent Protein

Chenxi Duan,<sup>†,‡,§,||</sup> Virgile Adam,<sup>†,‡,§,||</sup> Martin Byrdin,<sup>†,‡,§,||</sup> Jacqueline Ridard,<sup>⊥</sup> Sylvie Kieffer-Jaquinod,<sup>#,§</sup> Cécile Morlot,<sup>†,‡,§</sup> Delphine Arcizet,<sup>†,‡,§,||</sup> Isabelle Demachy,<sup>⊥</sup> and Dominique Bourgeois<sup>\*,†,‡,§,||</sup>

<sup>†</sup>Université Grenoble Alpes, Institut de Biologie Structurale (IBS), F-38027 Grenoble, France

<sup>‡</sup>CNRS, IBS, F-38027 Grenoble, France

<sup>§</sup>CEA, DSV, IBS, F-38027 Grenoble, France

<sup>||</sup>Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, IRTSV, CNRS/CEA/INRA/Université Grenoble Alpes, Grenoble, 38054, France

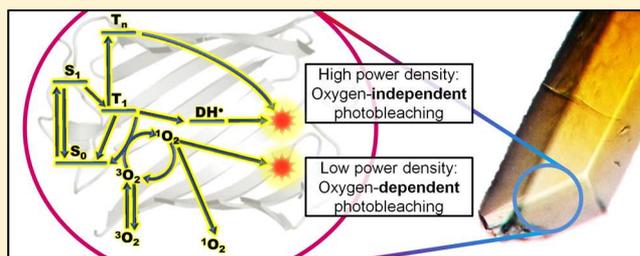
<sup>⊥</sup>Laboratoire de Chimie Physique, UMR 8000, CNRS, Université Paris Sud 11, 91405 Orsay, France

<sup>#</sup>Biologie à Grande Echelle, IRTSV, CEA, Grenoble, France

<sup>§</sup>INSERM, U1038, Grenoble, France

## Supporting Information

**ABSTRACT:** Photobleaching, the irreversible photodestruction of a chromophore, severely limits the use of fluorescent proteins (FPs) in optical microscopy. Yet, the mechanisms that govern photobleaching remain poorly understood. In Reversibly Switchable Fluorescent Proteins (RSFPs), a class of FPs that can be repeatedly photoswitched between nonfluorescent and fluorescent states, photobleaching limits the achievable number of switching cycles, a process known as photofatigue. We investigated the photofatigue mechanisms in the protein IrisFP using combined X-ray crystallography, optical *in crystallo* spectroscopy, mass spectrometry and modeling approaches. At laser-light intensities typical of conventional wide-field fluorescence microscopy, an oxygen-dependent photobleaching pathway was evidenced. Structural modifications induced by singlet-oxygen production within the chromophore pocket revealed the oxidation of two sulfur-containing residues, Met159 and Cys171, locking the chromophore in a nonfluorescent protonated state. At laser-light intensities typical of localization-based nanoscopy ( $>0.1 \text{ kW/cm}^2$ ), a completely different, oxygen-independent photobleaching pathway was found to take place. The conserved Glu212 underwent decarboxylation concomitantly with an extensive rearrangement of the H-bond network around the chromophore, and an  $sp^2$ -to- $sp^3$  hybridization change of the carbon atom bridging the chromophore cyclic moieties was observed. This two-regime photobleaching mechanism is likely to be a common feature in RSFPs from Anthozoan species, which typically share high structural and sequence identity with IrisFP. In addition, our results suggest that, when such FPs are used, the illumination conditions employed in localization-based super-resolution microscopy might generate less cytotoxicity than those of standard wide-field microscopy at constant absorbed light-dose. Finally, our data will facilitate the rational design of FPs displaying enhanced photoresistance.



## INTRODUCTION

Recent progresses in fluorescence bioimaging techniques have benefited from the rapid development of a large palette of fluorescent proteins (FPs).<sup>1</sup> However, the limited photostability of FPs has remained a major impediment to their successful use in many approaches including single-molecule, FRET, time-lapse or super-resolution microscopies. FPs typically can only emit  $\sim 10^5$  photons before their chromophores fall victim to irreversible photodestruction.<sup>2</sup> The detailed photophysical mechanisms leading to photobleaching in FPs remain largely unknown, although some structural insight has been obtained in the case of KillerRed, a highly phototoxic FP.<sup>3–5</sup> Successful efforts to obtain more photostable

variants have mainly relied on directed evolution approaches.<sup>2,6–8</sup>

In reversibly switchable fluorescent proteins (RSFPs),<sup>9</sup> photobleaching manifests itself in a process referred to as “photofatigue”. RSFPs can be repeatedly photoswitched between a fluorescent (on) and a nonfluorescent (off) state by illumination with visible light of appropriate wavelengths. Photoswitching capabilities are central to a growing number of advanced techniques including a variety of super-resolution modalities,<sup>10–14</sup> photochromic FRET,<sup>15</sup> optical lock-in detection,<sup>16</sup> frequency-domain imaging,<sup>17</sup> optogenetic manipula-

Received: July 5, 2013

Published: September 23, 2013

# Remodeling of the Z-Ring Nanostructure during the *Streptococcus pneumoniae* Cell Cycle Revealed by Photoactivated Localization Microscopy

Maxime Jacq, Virgile Adam, Dominique Bourgeois, Christine Moriscot, Anne-Marie Di Guilmi, Thierry Vernet, Cécile Morlot

University of Grenoble Alpes, IBS, Grenoble, France; CNRS, IBS, Grenoble, France; CEA, IBS, Grenoble, France

**ABSTRACT** Ovococci form a morphological group that includes several human pathogens (enterococci and streptococci). Their shape results from two modes of cell wall insertion, one allowing division and one allowing elongation. Both cell wall synthesis modes rely on a single cytoskeletal protein, FtsZ. Despite the central role of FtsZ in ovococci, a detailed view of the *in vivo* nanostructure of ovococcal Z-rings has been lacking thus far, limiting our understanding of their assembly and architecture. We have developed the use of photoactivated localization microscopy (PALM) in the ovococcus human pathogen *Streptococcus pneumoniae* by engineering spDendra2, a photoconvertible fluorescent protein optimized for this bacterium. Labeling of endogenously expressed FtsZ with spDendra2 revealed the remodeling of the Z-ring's morphology during the division cycle at the nanoscale level. We show that changes in the ring's axial thickness and in the clustering propensity of FtsZ correlate with the advancement of the cell cycle. In addition, we observe double-ring substructures suggestive of short-lived intermediates that may form upon initiation of septal cell wall synthesis. These data are integrated into a model describing the architecture and the remodeling of the Z-ring during the cell cycle of ovococci.

**IMPORTANCE** The Gram-positive human pathogen *S. pneumoniae* is responsible for 1.6 million deaths per year worldwide and is increasingly resistant to various antibiotics. FtsZ is a cytoskeletal protein polymerizing at midcell into a ring-like structure called the Z-ring. FtsZ is a promising new antimicrobial target, as its inhibition leads to cell death. A precise view of the Z-ring architecture *in vivo* is essential to understand the mode of action of inhibitory drugs (see T. den Blaauwen, J. M. Andreu, and O. Monasterio, *Bioorg Chem* 55:27–38, 2014, doi:10.1016/j.bioorg.2014.03.007, for a review on FtsZ inhibitors). This is notably true in ovococoid bacteria like *S. pneumoniae*, in which FtsZ is the only known cytoskeletal protein. We have used superresolution microscopy to obtain molecular details of the pneumococcus Z-ring that have so far been inaccessible with conventional microscopy. This study provides a nanoscale description of the Z-ring architecture and remodeling during the division of ovococci.

Received 3 July 2015 Accepted 22 July 2015 Published 18 August 2015

**Citation** Jacq M, Adam V, Bourgeois D, Moriscot C, Di Guilmi A-M, Vernet T, Morlot C. 2015. Remodeling of the Z-ring nanostructure during the *Streptococcus pneumoniae* cell cycle revealed by photoactivated localization microscopy. *mBio* 6(4):e01108-15. doi:10.1128/mBio.01108-15.

**Editor** Caroline S. Harwood, University of Washington

**Copyright** © 2015 Jacq et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported license](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/), which permits unrestricted noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Address correspondence to Cécile Morlot, [cecile.morlot@ibs.fr](mailto:cecile.morlot@ibs.fr), or Virgile Adam, [virgile.adam@ibs.fr](mailto:virgile.adam@ibs.fr).

The tubulin homologue FtsZ is the major bacterial cytoskeleton protein. *In vivo*, it forms 4- to 5-nm-thick and 40- to 120-nm-long filaments (1, 2) that assemble into an annular structure called the Z-ring, which is positioned at midcell underneath the cytoplasmic membrane and is required for cytokinesis. Filament turnover relies on polymerization/depolymerization cycles, during which GTP binding triggers head-to-tail association of FtsZ subunits and GTP hydrolysis causes dissociation of the polymers (3). These filaments act as scaffolding elements for the recruitment of various division proteins, including proteins in charge of FtsZ association with the cytoplasmic membrane, FtsZ filament organization, cell wall growth and remodeling, chromosome dimer resolution, membrane fission, and cell separation (3–5).

Beyond having a scaffolding function, FtsZ is most likely involved in the generation of the constrictive force required for cytokinesis (3). One model proposes that the Z-ring undergoes constriction through a sliding motion between FtsZ filaments (6, 7). Another model proposes that continued constriction arises from

the combination between FtsZ polymerization/depolymerization cycles and membrane bending induced by the curvature of nucleotide-bound FtsZ filaments (8–11). This model does not exclude the contribution of cell wall synthetic and remodeling enzymes to cytokinesis. Indeed, it is likely that the septal ingrowth of the cell wall pushes against the cytoplasmic membrane, contributing to the force required for invagination and to the stabilization of small local membrane constrictions (2, 12). Conversely, the constriction of FtsZ filaments will likely influence the kinetics of cell wall remodeling.

An important aspect of these models remains largely uncertain, namely, the structure adopted *in vivo* by FtsZ filaments at the nanoscale level. For many years since its initial observation by conventional fluorescence microscopy (13), the FtsZ macromolecular assembly has been modeled as a closed ring. Two electron cryotomography studies performed on *Caulobacter crescentus* and *Escherichia coli* cells provided controversial data, one showing loosely scattered bands of FtsZ protofilaments that support a

## Full-length structure of the major autolysin LytA

Qiong Li,<sup>a‡</sup> Wang Cheng,<sup>a‡</sup> Cécile Morlot,<sup>b,c,d</sup> Xiao-Hui Bai,<sup>a</sup> Yong-Liang Jiang,<sup>a</sup> Wenjia Wang,<sup>e</sup> David I. Roper,<sup>f</sup> Thierry Vernet,<sup>b,c,d</sup> Yu-Hui Dong,<sup>e</sup> Yuxing Chen<sup>a\*</sup> and Cong-Zhao Zhou<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Hefei National Laboratory for Physical Sciences at the Microscale and School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei, Anhui 230027, People's Republic of China, <sup>b</sup>Universite Grenoble Alpes, Institut de Biologie Structurale (IBS), F-38027 Grenoble, France, <sup>c</sup>CEA, DSV, IBS, F-38027 Grenoble, France, <sup>d</sup>CNRS, IBS, F-38027 Grenoble, France, <sup>e</sup>Beijing Synchrotron Radiation Facility, Institute of High Energy Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, People's Republic of China, and <sup>f</sup>School of Life Sciences, University of Warwick, Gibbet Hill Road, Coventry CV4 7AL, England. \*Correspondence e-mail: cyxing@ustc.edu.cn, zcz@ustc.edu.cn

Received 2 December 2014

Accepted 15 April 2015

Edited by Q. Hao, University of Hong Kong

‡ These authors contributed equally to this work.

**Keywords:** *Streptococcus pneumoniae*; crystal structure; peptidoglycan; autolysin; dimerization; choline-binding sites.

**PDB reference:** LytA, 4x36

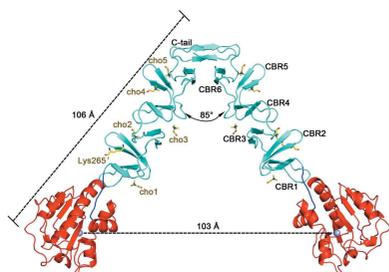
**Supporting information:** this article has supporting information at journals.iucr.org/d

LytA is responsible for the autolysis of many *Streptococcus* species, including pathogens such as *S. pneumoniae*, *S. pseudopneumoniae* and *S. mitis*. However, how this major autolysin achieves full activity remains unknown. Here, the full-length structure of the *S. pneumoniae* LytA dimer is reported at 2.1 Å resolution. Each subunit has an N-terminal amidase domain and a C-terminal choline-binding domain consisting of six choline-binding repeats, which form five canonical and one single-layered choline-binding sites. Site-directed mutageneses combined with enzymatic activity assays indicate that dimerization and binding to choline are two independent requirements for the autolytic activity of LytA *in vivo*. Altogether, it is suggested that dimerization and full occupancy of all choline-binding sites through binding to choline-containing TA chains enable LytA to adopt a fully active conformation which allows the amidase domain to cleave two lactyl-amide bonds located about 103 Å apart on the peptidoglycan.

### 1. Introduction

Peptidoglycan (PG), the main component of the cell wall, is essential for bacterial survival, and its synthesis and degradation are closely related to cell growth and division. Tailoring and recycling of the PG requires the cleavage of different covalent bonds of the PG sacculi by specific hydrolases (Vollmer *et al.*, 2008). The cell wall of various pathogens, including *Streptococcus pneumoniae*, contains choline groups on the cell-wall teichoic acids (TA) and the membrane-associated lipoteichoic acids (Tomasz, 1967). Some of the cell-wall hydrolases, which belong to the family of choline-binding proteins (CBPs), bind noncovalently to these choline groups through their choline-binding domain (CBD; Gosink *et al.*, 2000). The CBD usually contains multiple choline-binding repeats (CBRs) that share the consensus sequence GWXK-X<sub>4-5</sub>WYYφX<sub>3-5</sub>GXXM<sub>2-3</sub> (where X is any residue and φ is a hydrophobic residue; Hermoso *et al.*, 2005; Molina *et al.*, 2009).

In *S. pneumoniae*, the major autolysin LytA is a CBP that is responsible for the autolytic process occurring during the stationary phase (Mosser & Tomasz, 1970). Autolysis promotes the release of a variety of virulence factors, including the intracellular pneumolysin and soluble fragments of PG and TA (Cockeran *et al.*, 2002; Tuomanen *et al.*, 1985; Seo *et al.*, 2008). LytA specifically recognizes the nascent PG which becomes accessible after the release of the cell-wall



© 2015 International Union of Crystallography

RESEARCH ARTICLE

# Autophosphorylation of the Bacterial Tyrosine-Kinase CpsD Connects Capsule Synthesis with the Cell Cycle in *Streptococcus pneumoniae*

Julien Nourikyan<sup>1</sup>\*, Morten Kjos<sup>2</sup>\*, Chrystlène Mercy<sup>1</sup>, Caroline Cluzel<sup>3</sup>, Cécile Morlot<sup>4</sup>, Marie-Francoise Noirot-Gros<sup>5</sup>, Sébastien Guiral<sup>1</sup>, Jean-Pierre Lavergne<sup>1</sup>, Jan-Willem Veening<sup>2</sup>, Christophe Grangeasse<sup>1</sup>\*

**1** Bases Moléculaires et Structurales des Systèmes Infectieux, UMR5086 CNRS/Université de Lyon 1, Lyon, France, **2** Molecular Genetics Group, Groningen Biomolecular Sciences and Biotechnology Institute, Centre for Synthetic Biology, University of Groningen, Groningen, the Netherlands, **3** Laboratoire Biologie Tissulaire et Ingénierie thérapeutique, UMR5305, CNRS/Université de Lyon 1, Lyon, France, **4** Institut de Biologie Structurale, UMR5075 CNRS/CEA/Université Grenoble Alpes, Grenoble, France, **5** Micalis, UMR1319 INRA, Jouy-en-Josas, France

\* These authors contributed equally to this work.

\* [c.grangeasse@ibcp.fr](mailto:c.grangeasse@ibcp.fr).



 OPEN ACCESS

**Citation:** Nourikyan J, Kjos M, Mercy C, Cluzel C, Morlot C, Noirot-Gros M-F, et al. (2015) Autophosphorylation of the Bacterial Tyrosine-Kinase CpsD Connects Capsule Synthesis with the Cell Cycle in *Streptococcus pneumoniae*. PLoS Genet 11 (9): e1005518. doi:10.1371/journal.pgen.1005518

**Editor:** Patrick H. Viollier, University of Geneva Medical School, SWITZERLAND

**Received:** March 20, 2015

**Accepted:** August 21, 2015

**Published:** September 17, 2015

**Copyright:** © 2015 Nourikyan et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was funded by: Agence Nationale de la Recherche, ANR, ANR-2010-BLAN-1303-01, <http://www.agence-nationale-recherche.fr/>; Centre de la recherche scientifique, CNRS, <http://www.cnrs.fr/>; Université Claude Bernard Lyon I, UCBL, <http://www.univ-lyon1.fr/>; Région Rhône Alpes, ARC1, <http://www.arc1-sante.rhonealpes.fr/>; EMBO Young Investigator Programme, <http://www.embo.org/funding-awards/young-investigators>; Netherlands Organization for Scientific Research, Earth and Life

## Abstract

Bacterial capsular polysaccharides (CPS) are produced by a multi-protein membrane complex, in which a particular type of tyrosine-autokinases named BY-kinases, regulate their polymerization and export. However, our understanding of the role of BY-kinases in these processes remains incomplete. In the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*, the BY-kinase CpsD localizes at the division site and participates in the proper assembly of the capsule. In this study, we show that the cytoplasmic C-terminal end of the transmembrane protein CpsC is required for CpsD autophosphorylation and localization at mid-cell. Importantly, we demonstrate that the CpsC/CpsD complex captures the polysaccharide polymerase CpsH at the division site. Together with the finding that capsule is not produced at the division site in *cpsD* and *cpsC* mutants, these data show that CPS production occurs exclusively at mid-cell and is tightly dependent on CpsD interaction with CpsC. Next, we have analyzed the impact of CpsD phosphorylation on CPS production. We show that dephosphorylation of CpsD induces defective capsule production at the septum together with aberrant cell elongation and nucleoid defects. We observe that the cell division protein FtsZ assembles and localizes properly although cell constriction is impaired. DAPI staining together with localization of the histone-like protein HlpA further show that chromosome replication and/or segregation is defective suggesting that CpsD autophosphorylation interferes with these processes thus resulting in cell constriction defects and cell elongation. We show that CpsD shares structural homology with ParA-like ATPases and that it interacts with the chromosome partitioning protein ParB. Total internal reflection fluorescence microscopy imaging demonstrates that CpsD phosphorylation modulates the mobility of ParB. These data support a model in which phosphorylation of CpsD acts as a signaling

# Mechanism of $\beta$ -Lactam Action in *Streptococcus pneumoniae*: the Piperacillin Paradox

Jules Philippe,<sup>a,b,c</sup> Benoit Gallet,<sup>a,b,c</sup> Cécile Morlot,<sup>a,b,c</sup> Dalia Denapaité,<sup>d</sup> Regine Hakenbeck,<sup>d,e</sup> Yuxin Chen,<sup>f</sup> Thierry Vernet,<sup>a,b,c</sup> André Zapun<sup>a,b,c</sup>

Université Grenoble Alpes, IBS, Grenoble, France<sup>a</sup>; CNRS, IBS, Grenoble, France<sup>b</sup>; CEA, IBS, Grenoble, France<sup>c</sup>; Department of Microbiology, University of Kaiserslautern, Kaiserslautern, Germany<sup>d</sup>; Alfred Krupp Wissenschaftskolleg, Greifswald, Germany<sup>e</sup>; University of Science and Technology of China, Hefei, China<sup>f</sup>

The human pathogen *Streptococcus pneumoniae* has been treated for decades with  $\beta$ -lactam antibiotics. Its resistance is now widespread, mediated by the expression of mosaic variants of the target enzymes, the penicillin-binding proteins (PBPs). Understanding the mode of action of  $\beta$ -lactams, not only in molecular detail but also in their physiological consequences, will be crucial to improving these drugs and any counterresistances. In this work, we investigate the piperacillin paradox, by which this  $\beta$ -lactam selects primarily variants of PBP2b, whereas its most reactive target is PBP2x. These PBPs are both essential monofunctional transpeptidases involved in peptidoglycan assembly. PBP2x participates in septal synthesis, while PBP2b functions in peripheral elongation. The formation of the “lemon”-shaped cells induced by piperacillin treatment is consistent with the inhibition of PBP2x. Following the examination of treated and untreated cells by electron microscopy, the localization of the PBPs by epifluorescence microscopy, and the determination of the inhibition time course of the different PBPs, we propose a model of peptidoglycan assembly that accounts for the piperacillin paradox.

*Streptococcus pneumoniae* is a facultative bacterial pathogen that belongs to the human nasopharyngeal microbiota (1). When a pneumococcus invades other areas, it can cause mild diseases, such as otitis media, sinusitis, and bronchitis, or life-threatening pneumonia, meningitis, or septicemia. Following the introduction of  $\beta$ -lactams to treat bacterial infections, the first pneumococcal penicillin-resistant strain was reported in 1967 (2), and extensively multidrug-resistant pneumococci have now emerged (3, 4). Understanding the molecular mechanisms of antibiotic resistance in pneumococci is therefore of major importance.

$\beta$ -Lactam antibiotics interfere with the assembly of peptidoglycan, the main constituent of the bacterial cell wall. The peptidoglycan is a network of glycan chains reticulated by peptide links, constituting a single macromolecule that encases the cell. This essential layer protects bacteria from turgor pressure and provides a scaffold to anchor other surface molecules (5). Fine-tuning the dynamics of peptidoglycan assembly is essential for proper cell division and shape determination. In ovoid bacteria, the synthesis of peptidoglycan is thought to involve two machineries that allow bacteria to elongate and divide (6, 7). A set of six penicillin-binding proteins (PBPs) catalyzes the last step of peptidoglycan assembly in *S. pneumoniae*. The three class A PBPs (PBP1a, PBP1b, and PBP2a) are bifunctional enzymes that polymerize glycan chains (glycosyltransferase activity) and cross-link them through peptide bonds (transpeptidase activity). The two class B PBPs (PBP2x and PBP2b) are monofunctional transpeptidases. PBP3 is a class C PBP with D,<sub>2</sub>-carboxypeptidase activity, which is involved in the maturation of peptidoglycan (8). While the class A and C PBPs are not essential in pneumococci (9, 10), both class B PBPs are necessary, with PBP2b being essential for elongation and PBP2x for division (11–14). In pneumococci,  $\beta$ -lactam-resistant strains harbor PBP variants with reduced reactivities toward the drugs (15, 16).

An early study intended to correlate the specificities of 18  $\beta$ -lactams for different PBPs and the morphological defects they caused in *S. pneumoniae* (17). A very interesting phenotype of

pneumococcal cells was observed in the presence of piperacillin, an extended-spectrum  $\beta$ -lactam antibiotic used to treat polymicrobial infections (often in combination with tazobactam, a  $\beta$ -lactamase inhibitor) (18). The cells treated with 0.5 $\times$  MIC of piperacillin for 4 h acquired a characteristic lemon shape, with a central bulge and pointy ends (17). In addition, it was reported that piperacillin used at the MIC inhibits about 50% of PBP2b and PBP3 and 27% of PBP2a. However, since PBP2x was not known at that time because it comigrated with PBP2a in the experimental setup, the reported PBP2a inhibition corresponds to that of both PBP2x and PBP2a. Accordingly, PBP2x was not considered in the conclusions drawn at that time. Meanwhile, it is apparent that there is a complex redundancy of the different PBPs, and the morphological, physiological, and biochemical effects induced by one particular PBP remain largely open today.

Further studies investigated the resistance of pneumococci to piperacillin in the laboratory (19–21). Pneumococci were gradually selected in increasing concentrations of piperacillin, and the PBP sequences of the resulting strains were determined. Interestingly, in the three selected piperacillin-resistant lineages, PBP2b variants appeared first, and PBP2x variants were found only in strains subsequently selected for a higher resistance level (21). In

Received 12 September 2014 Returned for modification 18 October 2014

Accepted 5 November 2014

Accepted manuscript posted online 10 November 2014

Citation Philippe J, Gallet B, Morlot C, Denapaité D, Hakenbeck R, Chen Y, Vernet T, Zapun A. 2015. Mechanism of  $\beta$ -lactam action in *Streptococcus pneumoniae*: the piperacillin paradox. *Antimicrob Agents Chemother* 59:609–621. doi:10.1128/AAC.04283-14.

Address correspondence to André Zapun, andre.zapun@ibs.fr.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.04283-14>.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.04283-14

# A ring-shaped conduit connects the mother cell and forespore during sporulation in *Bacillus subtilis*

Christopher D. A. Rodrigues<sup>a,1</sup>, Xavier Henry<sup>b,1,2</sup>, Emmanuelle Neumann<sup>b</sup>, Vilius Kurauskas<sup>b</sup>, Laure Bellard<sup>b</sup>, Yann Fichou<sup>c</sup>, Paul Schanda<sup>b</sup>, Guy Schoehn<sup>b</sup>, David Z. Rudner<sup>a,3</sup>, and Cecile Morlot<sup>b,3</sup>

<sup>a</sup>Department of Microbiology and Immunobiology, Harvard Medical School, Boston MA 02115; <sup>b</sup>Institut de Biologie Structurale (IBS), Université Grenoble Alpes-Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives-CNRS, 38044 Grenoble, France; and <sup>c</sup>Institute for Physical Chemistry II, Ruhr-Universität Bochum, 44780 Bochum, Germany

Edited by Thomas J. Silhavy, Princeton University, Princeton, NJ, and approved August 26, 2016 (received for review June 14, 2016)

**During spore formation in *Bacillus subtilis* a transenvelope complex is assembled across the double membrane that separates the mother cell and forespore. This complex (called the “A–Q complex”) is required to maintain forespore development and is composed of proteins with remote homology to components of type II, III, and IV secretion systems found in Gram-negative bacteria. Here, we show that one of these proteins, SpoIIAG, which has remote homology to ring-forming proteins found in type III secretion systems, assembles into an oligomeric ring in the periplasmic-like space between the two membranes. Three-dimensional reconstruction of images generated by cryo-electron microscopy indicates that the SpoIIAG ring has a cup-and-saucer architecture with a 6-nm central pore. Structural modeling of SpoIIAG generated a 24-member ring with dimensions similar to those of the EM-derived saucer. Point mutations in the predicted oligomeric interface disrupted ring formation in vitro and impaired forespore gene expression and efficient spore formation in vivo. Taken together, our data provide strong support for the model in which the A–Q transenvelope complex contains a conduit that connects the mother cell and forespore. We propose that a set of stacked rings spans the intermembrane space, as has been found for type III secretion systems.**

sporulation | SpoIIAG | type III secretion system | EscJ/PrgK/FlfI | SigG

**T**ransport of proteins across the outer membrane of Gram-negative bacteria requires specialized secretion systems (1, 2). These transenvelope complexes span the inner and outer membranes and use ATP hydrolysis in the cytoplasm to power secretion across the outer membrane. Gram-positive bacteria lack an outer member and in most cases lack these specialized secretion systems. Endospore formation in bacteria such as *Bacillus subtilis* provides an unusual and noteworthy example of a Gram-positive, double-membrane envelope. As a result of the phagocytotic process of engulfment, the developing endospore (called the “forespore”) is released into its sister cell (referred to as the “mother cell”), surrounded by an inner membrane derived from the forespore and an outer membrane derived from the mother cell (Fig. 1B) (3). Intriguingly, the mother cell and forespore assemble a multimeric complex spanning these two membranes that bears similarity to specialized secretion systems and is required to maintain forespore development (4–9). It has been proposed that these proteins constitute a hybrid specialized secretion system with a channel connecting mother cell and forespore. Here we provide direct evidence that this complex contains a ring-like conduit in the space between the two membranes.

*B. subtilis* differentiates into a stress-resistant spore in response to nutrient limitation (3). The first morphological event in this process is the formation of an asymmetrically placed septum generating a small forespore and larger mother cell. Shortly afterwards, the mother cell membranes migrate around the forespore, generating a cell within a cell. Eight mother cell proteins encoded in the *spoIIA* operon (AA, AB, AC, AD, AE, AF, AG, and AH) and one forespore protein, SpoIIQ (Q), are required during and/or shortly after engulfment to maintain forespore development. Cells lacking any of these nine proteins have the same phenotype: The engulfed

forespores fail to grow to their full size and frequently develop membrane invaginations and appear to collapse (7, 10). In addition, these forespores are unable to maintain transcriptional potential including gene expression under the late-acting forespore transcription factor SigG (5, 7).

Previous work indicates that most of the A–Q proteins reside in a multimeric complex that spans the two membranes surrounding the forespore; for simplicity, we refer to this complex as a “transenvelope complex,” although whether it spans the nascent spore coat remains unclear (7). Q produced in the forespore localizes to the inner forespore membrane and is required for the localization of AH in the outer forespore membrane (11, 12). This localization is mediated by direct protein–protein interaction between the extracellular domains of AH and Q in the intermembrane space (Fig. 1B) (11, 12). Furthermore, coimmunoprecipitation experiments have shown that AB, AD, AE, AF, and AG reside in a multimeric membrane complex (7). Finally, AG has been found to localize in the membranes surrounding the forespore (Fig. 1A), and this localization depends on AH and Q (7).

The role of this complex in maintaining forespore development has been informed by the remote homologies (13) of many of the proteins in this complex (4, 6, 7). AA resembles secretion

## Significance

**Specialized secretion systems transport proteins across the double-membrane cell envelope of Gram-negative bacteria. Gram-positive bacteria possess a single membrane and lack many of these secretion systems. During endospore formation in Gram-positive bacteria such as *Bacillus subtilis*, a double-membrane envelope surrounds the developing spore. A transenvelope complex with similarities to Gram-negative specialized secretion systems spans the two membranes separating mother cell and endospore. This complex is essential for development and has been hypothesized to serve as a channel for molecular transport between the two cells. Here we show that it contains an oligomeric ring with architecture and dimensions similar to those found in type III secretion systems, providing direct evidence for a conduit connecting mother cell and developing spore.**

Author contributions: C.D.A.R., D.Z.R., and C.M. designed research; C.D.A.R., X.H., E.N., V.K., L.B., Y.F., P.S., G.S., D.Z.R., and C.M. performed research; C.D.A.R., X.H., E.N., V.K., Y.F., P.S., G.S., D.Z.R., and C.M. analyzed data; and C.D.A.R., E.N., P.S., G.S., D.Z.R., and C.M. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Data deposition: The cryo-EM 3D reconstruction map of the D1+D2 rings of SpoIIAG from *Bacillus subtilis* has been deposited in the EMDatabank (EMDB ID code [EMD-4072](https://www.ebi.ac.uk/EMDB/EMDB/4072)).

<sup>1</sup>C.D.A.R. and X.H. contributed equally to this work.

<sup>2</sup>Present address: Institut National de la Recherche Agronomique, UMR 1319 MICALIS, 78352 Jouy-en-Josas, France.

<sup>3</sup>To whom correspondence may be addressed. Email: [cecile.morlot@ibs.fr](mailto:cecile.morlot@ibs.fr) or [rudner@hms.harvard.edu](mailto:rudner@hms.harvard.edu).

This article contains supporting information online at [www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1609604113/-DCSupplemental](http://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1609604113/-DCSupplemental).

RESEARCH ARTICLE

Open Access



# *Enterococcus hirae* LcpA (Psr), a new peptidoglycan-binding protein localized at the division site

Maxime Maréchal<sup>1</sup>, Ana Amoroso<sup>1</sup>, Cécile Morlot<sup>2,3,4</sup>, Thierry Vernet<sup>2,3,4</sup>, Jacques Coyette<sup>1</sup> and Bernard Joris<sup>1\*</sup> 

## Abstract

**Background:** Proteins from the LytR-CpsA-Psr family are found in almost all Gram-positive bacteria. Although LCP proteins have been studied in other pathogens, their functions in enterococci remain uncharacterized. The Psr protein from *Enterococcus hirae*, here renamed LcpA, previously associated with the regulation of the expression of the low-affinity PBP5 and  $\beta$ -lactam resistance, has been characterized.

**Results:** LcpA protein of *E. hirae* ATCC 9790 has been produced and purified with and without its transmembrane helix. LcpA appears, through different methods, to be localized in the membrane, in agreement with *in silico* predictions. The interaction of LcpA with *E. hirae* cell wall indicates that LcpA binds enterococcal peptidoglycan, regardless of the presence of secondary cell wall polymers. Immunolocalization experiments showed that LcpA and PBP5 are localized at the division site of *E. hirae*.

**Conclusions:** LcpA belongs to the LytR-CpsA-Psr family. Its topology, localization and binding to peptidoglycan support, together with previous observations on defective mutants, that LcpA plays a role related to the cell wall metabolism, probably acting as a phosphotransferase catalyzing the attachment of cell wall polymers to the peptidoglycan.

**Keywords:** Enterococcus, Cell wall, Peptidoglycan, Bacterial division, LytR-CpsA-Psr

## Background

Enterococci are Gram-positive, facultative anaerobic cocci commensal bacteria [1]. These bacteria make up part of the normal human fecal flora but nowadays several enterococcal species emerge among major pathogens in hospital intensive care units. It is believed that their high prevalence in infections is somehow influenced by their resistance to the most commonly used antibiotics, along with the acquisition of virulence factors and their ability to form biofilms. Enterococcal's growth depends on cell wall (CW) synthesis. The cell wall is composed of three major constituents: peptidoglycan (PG), secondary cell wall polymers (SCWP), including teichoic acids and cell wall polysaccharides directly tethered to peptidoglycan through covalent linkages, and wall associated or wall anchored proteins [2]. PG is a polymer made of adjacent

glycan chains consisting of the repeating disaccharide N-acetylmuramic acid-( $\beta$ 1-4)-N-acetylglucosamine cross-linked by peptides [3]. Most of the enzymes that catalyze the last steps of PG synthesis are the Penicillin-Binding Proteins (PBPs). Some of them polymerize the glycan chains of the PG through their transglycosylase activity and reticulate the peptide chains through their transpeptidase activity. Penicillin (included in the  $\beta$ -lactam antibiotic family) binds covalently to these enzymes thereby inhibiting their transpeptidase activity. Enterococci are intrinsically resistant to  $\beta$ -lactams due to the expression of a PBP displaying a low affinity for these antibiotics [4, 5].

*Enterococcus hirae*, a species belonging to the *Enterococcus faecium* species group [6], was often used as a model organism for the study of PBPs. In *E. hirae* and *E. faecium*, the low-affinity PBP is a class B PBP designated as PBP5. In the presence of therapeutic  $\beta$ -lactam concentrations inhibiting all other PBPs, PBP5 keeps its transpeptidase activity, which in association with a monofunctional glycosyltransferase, allows synthesis of PG, as well as a

\* Correspondence: [bjoris@ulg.ac.be](mailto:bjoris@ulg.ac.be)

<sup>1</sup>Physiologie et génétique bactérienne, Centre d'Ingénierie des Protéines, Université de Liège, Institut de Chimie, Liège B-4000, Belgium  
Full list of author information is available at the end of the article



Review

# Resistance to $\beta$ -Lactams in *Neisseria ssp* Due to Chromosomally Encoded Penicillin-Binding Proteins

André Zapun<sup>1,\*</sup>, Cécile Morlot<sup>1</sup> and Muhamed-Kheir Taha<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institut de Biologie Structurale (IBS), University Grenoble Alpes, CEA, CNRS, Grenoble 38044, France; cecile.morlot@ibs.fr

<sup>2</sup> Invasive Bacterial Infection and National Reference Center for Meningococci, Institut Pasteur, Paris 75015, France; muhamed-kheir.taha@pasteur.fr

\* Correspondence: andre.zapun@ibs.fr; Tel.: +33-4-5742-8543

Academic Editor: Waldemar Vollmer

Received: 20 July 2016; Accepted: 23 September 2016; Published: 28 September 2016

**Abstract:** *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae* are human pathogens that cause a variety of life-threatening systemic and local infections, such as meningitis or gonorrhoea. The treatment of such infection is becoming more difficult due to antibiotic resistance. The focus of this review is on the mechanism of reduced susceptibility to penicillin and other  $\beta$ -lactams due to the modification of chromosomally encoded penicillin-binding proteins (PBP), in particular PBP2 encoded by the *penA* gene. The variety of *penA* alleles and resulting variant PBP2 enzymes is described and the important amino acid substitutions are presented and discussed in a structural context.

**Keywords:** *Neisseria meningitidis*; *Neisseria gonorrhoeae*;  $\beta$ -lactam resistance; penicillin-binding proteins

*Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae* are pathogens that have acquired reduced susceptibility to penicillin and other  $\beta$ -lactams via two routes. The modification of at least one chromosomally encoded penicillin-binding protein is the focus of this review. Alternatively, resistance to  $\beta$ -lactams may result from the production of a plasmid-encoded  $\beta$ -lactamase, which is common and also clinically relevant in *N. gonorrhoeae* [1–3], while it is rare in *N. meningitidis* [4]. Mutation in a porin and over expression of an efflux pump were also shown to contribute in *Neisseria gonorrhoeae* to  $\beta$ -lactam resistance [5].

Penicillin-binding proteins are the enzymes that assemble the peptidoglycan on the outer side of the plasma membrane to constitute the cell wall. Glycan chains are polymerized by a transglycosylase activity, whereas peptides attached to the saccharide units are cross-linked by a transpeptidase activity. The transpeptidase activity is normally inhibited by  $\beta$ -lactams that form a covalent adduct to the active site serine residue, owing to their high reactivity and likeness to the terminal dipeptide that is the physiological substrates for the transpeptidation [6,7]. *Neisseria* species have four PBPs. PBP1 is a bifunctional transglycosylase and transpeptidase, PBP2 is a monofunctional transpeptidase, whereas PBP3 and PBP4 are low-molecular weight carboxypeptidases/endopeptidases [8]. Note that PBP4 is not revealed by labeling with radio-active  $\beta$ -lactams in vivo, although it is highly reactive in vitro. PBP4 is likely not expressed at high level in laboratory conditions.

*N. gonorrhoeae* and *N. meningitidis* are exclusively human bacteria and are the two pathogenic species of the genus *Neisseria*. Both bacteria interact with mucosal surfaces (mainly the nasopharynx for meningococci and the genito-urinary tract for gonococci). Meningococci may cross the epithelial barrier to invade and spread through the bloodstream, often causing fatal *purpura fulminans*, to reach the central nervous system, resulting in meningitis. Gonococci colonize and invade the epithelium of the genito-urinary tract and provoke local infection (gonorrhoea) but rarely invade blood to cause systemic infections. The presence of gonococci, frequently asymptomatic, in the rectum and/or in

# SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

## Autocatalytic association of proteins by covalent bond formation: a Bio Molecular Welding toolbox derived from a bacterial adhesin

Received: 06 October 2016

Accepted: 25 January 2017

Published: 02 March 2017

J. Bonnet<sup>1</sup>, J. Cartannaz<sup>1</sup>, G. Tourcier<sup>2</sup>, C. Contreras-Martel<sup>1</sup>, J. P. Kleman<sup>1</sup>, C. Morlot<sup>1</sup>, T. Vernet<sup>1</sup> & A. M. Di Guilmi<sup>1</sup>

Unusual intramolecular cross-links present in adhesins from Gram-positive bacteria have been used to develop a generic process amenable to biotechnology applications. Based on the crystal structure of RrgA, the *Streptococcus pneumoniae* pilus adhesin, we provide evidence that two engineered protein fragments retain their ability to associate covalently with high specificity, *in vivo* and *in vitro*, once isolated from the parent protein. We determined the optimal conditions for the assembly of the complex and we solved its crystal structure at 2 Å. Furthermore, we demonstrate biotechnological applications related to antibody production, nanoassembly and cell-surface labeling based on this process we named Bio Molecular Welding.

Cross-linking of amino acid side chains is an efficient way to promote protein folding and stabilization at the post-translational level. The most common feature is the formation of intra- or intermolecular disulfide bonds to stabilize tertiary and quaternary structures, respectively. One prominent example is given by antibody molecules, whose disulfide-bond mediated stability in blood circulation is crucial for efficient function. Interactions of Gram-positive bacteria with host organisms are resolved by adhesins like pilins and MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) in which unusual intramolecular cross-links have been recently discovered<sup>1–3</sup>. As adhesins are surface-exposed proteins, they must resist various antibacterial defense mechanisms like degradation by enzymes (proteases, peroxidases) or unfolding upon pH changes. The covalent linkages present in adhesins enhance their thermal stability and resistance to proteases degradation, thus stabilizing their tertiary structure<sup>4–8</sup>. In the case of pili, the presence of these isopeptide bonds, together with the fact that pilins are covalently linked to each other, make Gram-positive pili highly resistant to mechanical stress and degradation<sup>9</sup>.

Pilins and MSCRAMMs share a common topology: a N-terminal signal peptide followed by extracellular domain(s), a cell wall sorting motif (Leu-Pro-x-Thr-Gly or a variant) recognized by sortases which covalently anchor proteins to peptidoglycan, a transmembrane helix and a short cytoplasmic sequence. Most pilins and MSCRAMMs have an elongated shape formed by the association of domains, which resemble Ig-like  $\beta$ -sandwich domains<sup>2</sup>. Intramolecular isopeptide bonds are mostly formed between the side chains of Lys and Asn, although Lys-Asp bonds also exist<sup>5,10</sup>. These residues are positioned in a hydrophobic core in which the pKa of the Lys is reduced, allowing nucleophilic attack of the C $\delta$  atom of either Asn or Asp, followed by a proton shuttle involving an adjacent Glu or Asp<sup>5,10,11</sup>. Although not involved in protein stabilization, thioester bonds established between Cys and Gln residues have also been described<sup>5</sup>. The last intramolecular bond reported is an ester bond formed between a Thr and a Gln side chain in a putative *Clostridium perfringens* MSCRAMMs, through an autocatalytic mechanism that differs from that of Lys-Asn/Asp bonds<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Institut de Biologie Structurale (IBS), Univ. Grenoble Alpes, CEA, CNRS, 38044 Grenoble, France. <sup>2</sup>Institut de Biosciences et Biotechnologies de Grenoble (BIG), Univ. Grenoble Alpes, CEA, CNRS, 38044 Grenoble, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to T.V. (email: thierry.vernet@ibs.fr) or A.M.D.G. (email: anne-marie.di-guilmi@ibs.fr)