

Université de Montréal

**Caractérisation du rôle du facteur ElyC dans la biogenèse  
de l'enveloppe chez l'organisme modèle *Escherichia coli***

Par

Imène Kouidmi

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor  
en microbiologie et immunologie

Décembre, 2017

© Imène Kouidmi, 2017

## Résumé

Le peptidoglycane (PG) est le composant principal de l'enveloppe bactérienne, il protège les cellules de la pression osmotique. Un défaut dans le PG cause la lyse de la bactérie. De ce fait, le mécanisme de biosynthèse du PG une excellente cible antibactérienne. Cependant, la biosynthèse du PG et les mécanismes de régulation qui assurent le maintien de l'intégrité de ce composant de l'enveloppe, ne sont pas totalement connus. Dans le but d'élargir nos connaissances quant à ces mécanismes, nous avons choisi d'étudier le rôle du facteur ElyC nouvellement identifié chez *Escherichia coli*. Ce facteur est important pour le maintien de l'intégrité du PG à 21 °C. Le mutant  $\Delta elyC$  présente un arrêt de la biosynthèse du PG, suivi de la lyse de la bactérie à la fin de la phase exponentielle de croissance à 21 °C.

Premièrement, nous avons identifié les protéines périplasmiques, DsbG et Spy, comme suppresseurs multicopies du phénotype de lyse du mutant  $\Delta elyC$  à 21 °C. Nous avons démontré que ces protéines agissent par leur activité chaperonne pour corriger un défaut de repliement des protéines dans l'enveloppe, ce qui rétablissent totalement le défaut de PG chez le mutant  $\Delta elyC$  à 21 °C. Ces résultats suggèrent que la biosynthèse du PG pourrait être bloquée en raison d'un défaut de repliement des protéines de l'enveloppe.

Deuxièmement, nous avons étudié l'importance d'ElyC à 37 °C. Nous avons démontré que ElyC est aussi importante pour la biosynthèse du PG à 37 °C. En effet, l'analyse de la composition du PG a démontré une diminution de la quantité de ce composé à 21 °C et à 37 °C. Néanmoins, cette diminution était plus importante à 21 °C, Ce qui démontre que le taux de biosynthèse du PG diminue en absence du facteur ElyC et cette diminution devient plus sévère à basse température. Cela suggère que ElyC est impliquée dans un mécanisme dit « Cold sensitive » (Cs).

Finalement, nous avons analysé la réponse transcriptomique induite en absence du facteur ElyC dans les deux conditions de températures. Cette réponse était proportionnelle au degré des dommages dans le PG. Le nombre de gènes différemment exprimés chez le mutant  $\Delta elyC$  par rapport à une souche sauvage était plus élevé à 21 °C qu'à 37 °C. De plus, plusieurs systèmes

de réponse aux stress dans l'enveloppe étaient activés chez le mutant à 21 °C, entraînant l'induction de plusieurs gènes impliqués dans des mécanismes de réparations et de résistances aux stress affectant l'enveloppe. Cependant, la réponse au stress dans l'enveloppe était plus modérée chez le mutant  $\Delta elyC$  à 37 °C. Cette analyse a aussi démontré une diminution dans l'expression de plusieurs gènes impliqués dans des fonctions physiologiques au niveau de la membrane interne, aux deux températures, ce qui suggère une perturbation au niveau de cette membrane.

En conclusion, ce travail a démontré que ElyC est un facteur important à la biosynthèse du PG à 21 °C et à 37 °C. Son rôle serait de réguler le mécanisme de la biosynthèse du PG.

**Mots-clés :** *Escherichia coli*, peptidoglycane, chaperonnes, ElyC, 21°C, 37°C, « Cold sensitive ».

## Abstract

Peptidoglycan (PG) is the main structural component of bacterial envelope and it protects bacterial cells against osmotic pressure. Defects in PG cause bacterial cell lysis. Therefore, the pathway for PG synthesis is one of the best sources of antibacterial targets. However, the molecular assembly of PG and the regulatory pathways for the maintenance of this critical envelope layer are still not well understood. To broaden our understanding of these processes, we aimed to study the newly discovered *Escherichia coli* factor ElyC that is needed for maintaining PG integrity at 21°C. The  $\Delta elyC$  mutant presents a PG biosynthesis arrest followed by bacterial cell lysis at the end of the logarithmic phase of growth at 21°C.

First, we identified the periplasmic proteins, DsbG and Spy, as multi-copy suppressors of the  $\Delta elyC$  lysis phenotype at 21°C. We showed that these suppressors act by a chaperone activity to restore protein folding defect in the envelope compartment of the mutant which fully correct the PG synthesis defect at 21°C. These results suggest that the PG biosynthesis is blocked due to a protein folding defect in the envelope.

Secondly, we evaluated the requirement of ElyC for cell growth and PG synthesis at 37°C. We showed that ElyC is also important for PG biosynthesis at 37°C. In fact, the compositional analysis of PG revealed a decrease in the amount of this compound either at 21 or 37°C. Nevertheless, this decrease was greater at 21°C, which might explain the lysis of the mutant at this temperature. These results demonstrate that the rate of PG biosynthesis decreases in the absence of ElyC factor and this decrease becomes more severe at low temperature. This suggested that ElyC plays an important role in a cold sensitive process.

Finally, we analysed the transcriptomic response in ElyC defective cells at both temperatures. The response was proportional to the degree of PG damages. The number of differentially expressed genes in the  $\Delta elyC$  compared to wild-type strain was higher at 21°C than at 37°C. Furthermore, several envelope stress response systems were activated at 21°C, leading to the induction of several genes involved in mechanisms such as envelope stress resistance and damage repair. However, the envelope stress response was moderate at 37°C.

The analysis of downregulated genes in the  $\Delta elyC$  mutant showed that several of these genes are involved in mechanisms taking place in the inner membrane, which suggested a defect at the level of this compartment.

In conclusion, this work demonstrated that ElyC is an important factor for PG biosynthesis at all tested temperatures. ElyC might be a direct or indirect regulator of PG biosynthesis mechanism.

**Keywords:** *Escherichia coli*, peptidoglycan, chaperones, ElyC, 21°C, 37°C, cold sensitive.

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures .....	ix
Liste des abréviations.....	xi
Remerciements.....	xv
CHAPITRE 1 - Introduction.....	1
1.1 - Structure et composition de l'enveloppe des bactéries Gram-négatifs.....	2
1.1.1 - La membrane interne .....	2
1.1.2 - La membrane externe .....	3
1.1.3 - La paroi et l'espace périplasmique .....	4
1.2 - Les mécanismes de biosynthèse et d'assemblage de l'enveloppe chez <i>E. coli</i> .....	5
1.2.1 - Les systèmes de sécrétion des protéines à travers la membrane interne .....	6
1.2.2- Les mécanismes d'intégration des protéines dans la membrane interne .....	9
1.2.3 - L'intégration des protéines dans la membrane externe par le système Bam.....	11
1.2.4 - La biosynthèse et l'export des lipoprotéines .....	13
1.2.5 - L'assemblage et le transport des lipopolysaccharides .....	15
1.2.6 - La construction du polymère de peptidoglycane .....	18
1.3 - Le repliement des protéines dans le périplasme .....	25
1.3.1 - Formation des ponts disulfures par le système Dsb .....	25
1.3.2 - Isomérisation <i>cis-trans</i> des chaînes peptidiques.....	28
1.3.3 - Le repliement des protéines par des chaperonnes .....	29
1.4 - La protection et la réparation des cystéines de l'oxydation chez <i>E. coli</i> .....	33
1.4.1 - La production des dérivés réactifs de l'oxygène .....	33
1.4.2 - Oxydation des cystéines .....	35
1.4.3 - Mécanismes de protection des cystéines de l'oxydation dans le périplasme .....	36
1.4.4- La structure de DsbC et DsbG .....	38
1.4.5 - La spécificité de la fonction de DsbC et DsbG .....	39

1.5 - Les systèmes de réponse au stress dans l'enveloppe .....	40
1.5.1 - Système de réponse à un problème de repliement des protéines de l'enveloppe ..	40
1.5.2 - Le système Rcs .....	45
1.5.3 - Le système EnvZ/OmpR .....	47
1.5.4 - Le système Bae.....	48
1.5.5 - Le système sigma S .....	48
1.6 - Identification de nouveaux facteurs pour la biogénèse de l'enveloppe chez <i>E. coli</i> ....	49
1.6.1 - Essai CPRG .....	50
1.6.2 - Criblage de la banque Keio .....	51
1.6.3 - Le facteur ElyC.....	51
1.6.4 - Phénotypes du mutant $\Delta elyC$ .....	52
1.6.5 - Implication du facteur ElyC dans la biosynthèse du PG à température pièce.....	54
1.6.6 - Les étapes de biosynthèse du PG affectées par l'absence de ElyC .....	56
1.6.7 – Stress oxydatif chez le mutant $\Delta elyC$ .....	59
1.7 – Problématique et objectifs.....	61
Préface au Chapitre 2 .....	63
CHAPITRE 2 : Article I .....	64
Summary .....	65
Introduction.....	66
Results .....	69
Discussion.....	75
Experimental Procedures .....	78
References.....	81
Acknowledgments.....	85
Figures.....	86
Supplementary Materials .....	94
Préface au Chapitre 3 .....	104
CHAPITRE 3: Article II .....	105
Abstract .....	106
Importance .....	107

Introduction.....	108
Materials and Methods.....	111
Results.....	114
Discussion.....	121
Acknowledgements.....	125
References.....	126
Tables and Figures .....	132
Supplementary Materials .....	150
<b>CHAPITRE 4 - Discussion .....</b>	<b>153</b>
4.1 - Importance du facteur ElyC dans la biosynthèse du PG à 21 °C et 37 °C .....	153
4.2 – Défaut de repliement des protéines dans l'enveloppe chez le mutant $\Delta elyC$ .....	155
4.3 – L'activation des systèmes de réponse au stress dans l'enveloppe chez le mutant $\Delta elyC$ .....	157
4.4 – Diminution de l'expression des gènes codant des composants de la chaîne respiratoire chez le $\Delta elyC$ .....	159
4.5 – Diminution de l'expression des gènes de la machinerie d'export des protéines chez le $\Delta elyC$ .....	161
4.6 – L'effet de la température sur le phénotype du mutant $\Delta elyC$ .....	162
Conclusion et Perspectives .....	164
Bibliographie.....	167
ANNEXE I : Article publié non discuté dans cette thèse .....	i

## Liste des tableaux

### Chapitre 2 :

<b>Table S1.</b> Muropeptide corresponding peaks.....	94
<b>Table S2.</b> Muropeptide relative abundance.....	95
<b>Table S3.</b> Muropeptide composition.....	96
<b>Table S4.</b> Strains used in this study.....	96
<b>Table S5.</b> Plasmids used in this study.....	98
<b>Table S6.</b> Primers used in this study.....	100

### Chapitre 3 :

<b>Table 1.</b> Upregulated genes in the $\Delta elyC$ mutant cells at 21°C.....	132
<b>Table 2.</b> Upregulated genes in the $\Delta elyC$ mutant cells at 37°C.....	138
<b>Table 3.</b> Downregulated genes in the $\Delta elyC$ mutant cells at 21°C.....	140
<b>Table 4.</b> Downregulated genes in the $\Delta elyC$ mutant cells at 37°C.....	143
<b>Table S1.</b> Muropeptide relative abundance.....	150
<b>Table S2.</b> Muropeptide composition.....	151
<b>Table S3.</b> The raw read statistics of the RNAseq samples.....	152

# Liste des figures

## Chapitre 1 :

<b>Figure 1.</b> Représentation schématique de l'architecture et de la composition de l'enveloppe des bactéries à Gram-négatif.....	5
<b>Figure 2.</b> Sécrétion des protéines de l'enveloppe par le système Sec selon le mode post-traductionnel.....	7
<b>Figure 3.</b> Translocation des protéines repliées ou associées à un cofacteur à travers la membrane interne par le système Tat.....	9
<b>Figure 4.</b> Insertion des protéines dans la membrane interne.....	11
<b>Figure 5.</b> Insertion des protéines dans la membrane externe par le système Bam.....	13
<b>Figure 6.</b> La biosynthèse des lipoprotéines et le transport par le système Lol.....	15
<b>Figure 7.</b> L'assemblage des LPS et leur transport vers la membrane externe.....	17
<b>Figure 8.</b> Schéma représentatif de l'étape cytoplasmique, membranaire et périplasmique de la biosynthèse du peptidoglycane.....	19
<b>Figure 9.</b> Les sites de coupure des hydrolases dans le peptidoglycane.....	25
<b>Figure 10.</b> La formation des ponts disulfures par le système Dsb.....	28
<b>Figure 11.</b> Oxydation des cystéines.....	36
<b>Figure 12.</b> Système de réduction des cystéines libres dans le périplasme chez <i>E. coli</i> .....	38
<b>Figure 13.</b> Structure de DsbC (PDB : 1EEJ) (A) et DsbG (PDB : 1V58) (B).....	39
<b>Figure 14.</b> Les systèmes de réponse au stress, $\sigma^E$ et Cpx, chez <i>Escherichia coli</i> .....	44
<b>Figure 15.</b> Principe de l'essai phénotypique CPRG.....	50
<b>Figure 16.</b> Topologie prédite de ElyC.....	52
<b>Figure 17.</b> Phénotypes du mutant $\Delta elyC$ à température pièce.....	54
<b>Figure 18.</b> Le mutant $\Delta elyC$ présente un défaut de biosynthèse du PG à température pièce.....	56
<b>Figure 19.</b> Suppresseurs génétiques du mutant $\Delta elyC$ à température pièce.....	57
<b>Figure 20.</b> Interaction génétique entre ElyC et la biosynthèse de ECA.....	59

## **Chapitre 2 :**

<b>Figure 1.</b> Overexpression of the periplasmic reductase DsbG suppresses the $\Delta elyC$ mutant lysis phenotype.....	86
<b>Figure 2.</b> DsbG does not act on the L,D-transpeptidases to suppress the $\Delta elyC$ lysis phenotype.....	87
<b>Figure 3.</b> DsbG does not act by its reductase activity.....	88
<b>Figure 4.</b> Overexpression of the periplasmic chaperone Spy suppresses the $\Delta elyC$ mutant lysis defect at 21°C.....	89
<b>Figure 5.</b> The overexpression of DsbG and Spy restores the peptidoglycan biosynthesis in the $\Delta elyC$ .....	90
<b>Figure 6.</b> Microscopic analysis of cell shape reveal that DsbG overexpression causes the $\Delta elyC$ mutant cells to widen.....	91
<b>Figure 7.</b> The relative amount of protein aggregates.....	92
<b>Figure 8.</b> Speculative Model.....	93
<b>Figure. 1S.</b> CPRG Phenotype of the strains, Δ3 ( $\Delta ybiS \Delta ynhG \Delta erfK$ ); and Δ5 ( $\Delta ybiS \Delta ynhG \Delta erfK \Delta ycbB \Delta ycf$ ) at 21°C.....	102

## **Chapitre 3 :**

<b>Figure 1.</b> The loss of ElyC results in a growth defect at 21°C but not at 37°C.....	145
<b>Figure 2.</b> Peptidoglycan analysis showed a decrease in PG amount in the $\Delta elyC$ cells at 21°C and 37°C.....	146
<b>Figure 3.</b> The mutant $\Delta elyC$ is sensitive to $\beta$ -lactams antibiotics at 37°C.....	147
<b>Figure 4.</b> Global representation of the RNAseq analysis data of the samples.....	148
<b>Figure 5.</b> Functional classification of genes differentially expressed in the $\Delta elyC$ mutant comparatively to wild-type strain at 21°C and 37°C.....	149

## Liste des abréviations

ATP	Adénosine triphosphate
ABC	<i>ATP-Binding Cassette</i>
Ala	Alanine
Ami	Amidase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ATPase	Adénosine triphosphate synthétase
Bam	<i>b-barrel assembly machinery</i>
CPase	Carboxypeptidases
CPRG	<i>Chlorophenyl red-β-D-galactopyranoside</i>
Cs	Cold sensitive
Da	Dalton
DAP	<i>Diaminopimelic acid</i>
Dsb	Disulfide bond
DUF	<i>Domain of Unknown Function</i>
ECA	<i>Enterobacterial Commun Antigen</i>
EPase	Endopeptidases
GlcNAc	N-acétylglycosamine
Glu	Glutamine
GTase	Glycosyl Transférase
GTP	Guanosine triphosphate
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
IM	<i>Inner Membrane</i>
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
kDa	Kilo Dalton
LacZ	β-galactosidase
LB	Luria-Bertani
Lol	<i>Localisation of lipoprotein</i>
LPP	Lipoprotéine de Braun

LPS	Lipopolysaccharide
Lpt	<i>Lipopolysaccharide transport</i>
<i>m</i> A <sub>2</sub> pm	<i>méso</i> -diaminopimélique
MurNAc	N-acétylmuramique
NaCl	Chlorure de sodium
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
O <sub>2</sub>	Oxygène
O <sub>2</sub> •-	Ion superoxyde
OD600	<i>Optical density at 600 nm</i>
ODD	<i>Outer-membrane Docking Domaine</i>
OH•	Radical hydroxyle
OM	<i>Outer Membrane</i>
OMP	<i>Outer-Membrane Protein</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PBP	<i>Penicillin Binging Protein</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PG	Peptidoglycane
PMF	<i>Proton Motive Force</i>
PMSF	Fluorure de Phénylméthylsulfonyle
PPIase	Peptidyl-prolyl isomérase
RNAseq	<i>RNA-sequencing</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SOD	Superoxyde dismutase
SPase	<i>Signal Peptidase</i>
SRP	<i>Signal Recognition Particle</i>
Tat	<i>Twin-arginine-translocation</i>
TF	<i>Trigger Factor</i>
Tpase	Transpeptidase
UB2H	<i>UvrB domain 2 Homolog</i>

UDP	Uridine diphosphate
Und-P	Undécarpenyl-phosphate
Und-PP	Undécaprényl pyrophosphate
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
WT	<i>Wild-type</i>

*La connaissance, c'est partager le savoir qui nous fait grandir*

*Olivier Lockert*

## **Remerciements**

J’aimerais tout d’abord remercier les membres du jury, dont Dr France Daigle, Dr Frédéric Veyrier, Dr Daniel Dubreuil et Dr Marc Drolet. Vous avez généreusement accepté de consacrer du temps pour évaluer cette thèse, et je vous en remercie du fond du cœur. Je souhaite également remercier ma directrice de recherche Dr Catherine Paradis-Bleau qui m’a donné l’opportunité de travailler dans son laboratoire. Tu m’as beaucoup appris et tu m’as permis d’évoluer en tant que scientifique durant ces 5 ans, je t’en suis très reconnaissante.

Un grand merci pour Dr Marc Drolet. Je suis infiniment reconnaissante pour ton soutien, ton écoute attentive et ton encadrement. Tu m’as beaucoup encouragée et tu as généreusement offert ton temps et ton énergie pour corriger mes articles et ma thèse. Ton expertise et tes conseils sont très importants pour moi.

J’ai eu le bonheur de travailler avec des collègues magnifiques dont plusieurs sont devenus de très bons amis. Nous avons beaucoup ri ensemble et nous nous sommes toujours soutenus. Merci d’avoir rendu l’ambiance de travail très agréable. Je remercie plus particulièrement Sean Giacomucci, Rim Marrakchi, Larbi Mokhtari et Gabrielle Gendron-Lepage pour votre aide et vos conseils durant cette dernière année de thèse, nous avons formé une super équipe !

Je tiens à témoigner ma reconnaissance à mes collègues du département, aux professeurs et au personnel administratif et technique qui m’ont appuyée tout au long de mon doctorat. Merci pour votre bonne humeur et votre gentillesse. Je remercie aussi les professeurs de l’université USTHB en Algérie qui m’ont beaucoup appris durant mon baccalauréat et ma maîtrise. J’aimerais exprimer toute ma gratitude à Dr Mehdi Bourouba de m’avoir fortement recommandée au Dr Catherine Paradis Bleau comme étudiante au doctorat.

Je souhaite remercier mes parents, Kamir et Samir, de tout mon cœur pour leur amour et leur encouragement. Merci de m’avoir permis de poursuivre mes rêves et mes ambitions, même si cela m’emmenait loin de vous. Je sais que ce n’était pas facile pour vous de me laisser partir.

Je vous serai toujours reconnaissante de ce très grand sacrifice. Vous êtes les meilleurs ! Je vous aime énormément.

Un merci spécial à ma famille qui m'a donné beaucoup d'amour durant toute ma vie et particulièrement à mon frère, ma sœur et mes grands-parents. Durant ces 5 ans au Canada, j'ai rencontré des personnes extraordinaires et je pense particulièrement à Paola et à Charlotte. Vous êtes devenues ma deuxième famille. Merci d'avoir toujours été là pour moi de m'avoir soutenue, encouragée, supportée (dans tous les sens du terme) et d'avoir pris soin de moi.

## CHAPITRE 1 - Introduction

L'enveloppe bactérienne est une structure complexe qui entoure et délimite la cellule bactérienne. Cette structure est essentielle pour la survie de la bactérie et assure de multiples fonctions. Elle protège la bactérie des variations de la pression osmotique et des agressions extérieures tout en permettant l'import sélectif des nutriments vers l'intérieur de la cellule et l'export des toxines vers le milieu extérieur (Dufresne & Paradis-Bleau, 2015). L'enveloppe est le lieu où se déroulent d'importantes réactions, dont celle du transfert d'électrons de la chaîne respiratoire qui permet la production de deux formes d'énergie cellulaire : la force protomotrice au niveau de l'enveloppe, et l'ATP dans le cytoplasme (Costerton, Ingram, & Cheng, 1974). L'enveloppe joue un rôle important dans la pathogénie bactérienne; elle constitue le premier point de contact de la bactérie avec le système immunitaire de l'hôte et devient ainsi le lieu de détection des dangers externes et de transduction du signal visant à l'activation des systèmes de défense bactérienne. Dans certains cas, l'enveloppe constitue le point d'ancre à une variété de structures impliquées dans la virulence (ex : flagelle, pili ou fimbriae) (Raivio, 2005; Ramos, Rumbo, & Sirard, 2004).

En général, les bactéries sont classées selon l'architecture de leur enveloppe, en deux groupes majeurs: les Gram-négatifs et les Gram-positifs (Silhavy, Kahne, & Walker, 2010). Cette classification se base sur le résultat obtenu suite à la coloration de Christian Gram au cristal violet. Les bactéries Gram-positifs possèdent une paroi bactérienne épaisse qui retient le cristal violet, alors que les bactéries avec une paroi fine perdent le colorant et sont dites Gram-négatifs (Popescu & Doyle, 1996). L'enveloppe de ces dernières est composée d'une membrane interne et d'une membrane externe, et entre les deux se trouve l'espace périplasmique et une fine couche de paroi composée principalement de peptidoglycane (PG) (Figure 1). Les Gram-positifs sont dépourvues de membrane externe et possèdent une épaisse couche de paroi qui est directement en contact avec l'espace extra-cytoplasmique.

Les bactéries Gram-négatifs sont les plus résistantes aux antibiotiques comparativement aux Gram-positifs et cela en raison du degré d'imperméabilité de leur enveloppe. La présence d'une membrane externe chez les Gram-négatifs complique l'entrée des antibiotiques dans la cellule (Delcour, 2009). De plus, ces dernières années, plusieurs bactéries Gram-négatifs, impliquées dans de nombreuses pathologies sévères, ont développé divers mécanismes de

résistance aux antibiotiques, dont la production de  $\beta$ -lactamases, la modification de l'enveloppe ou la production de pompes à efflux pour des molécules antibactériennes (Lautenbach & Polk, 2007; Slama, 2008). Il est donc impératif d'élargir nos connaissances quant au fonctionnement de ce compartiment cellulaire afin de développer de nouvelles stratégies de traitement des infections causées par des souches bactériennes Gram-négatifs.

## 1.1 - Structure et composition de l'enveloppe des bactéries Gram-négatifs

### 1.1.1 - La membrane interne

La membrane interne est organisée en double couche de phospholipides dans laquelle la queue hydrophobe est orientée vers l'intérieur de la membrane et la tête polaire vers l'extérieur (Figure 1). Les phospholipides prédominants chez *Escherichia coli* (*E. coli*) sont la phosphatidyléthanolamine, la phosphatidylglycérol et, en plus faible quantité, la cardiolipine et la phosphatidylsérine (Silhavy et al., 2010). La plupart des phospholipides membranaires chez les bactéries sont des glycérophospholipides contenant deux chaînes d'acides gras avec des longueurs variant de 14 à 20 atomes de carbone (Zhang & Rock, 2008). La structure de ces chaînes, incorporées dans les phospholipides, est ce qui détermine principalement la viscosité de la membrane. Les bactéries ajustent constamment la composition de leur membrane en modifiant et en synthétisant de nouveaux acides gras afin de s'adapter aux différents environnements et conditions de stress (Zhang & Rock, 2008).

Dans la membrane interne se trouve aussi de nombreuses protéines insérées dans la double couche lipidique ainsi que des lipoprotéines. Chez *E. coli* 20 % à 30 % des protéines totales se trouvent dans la membrane interne (Facey & Kuhn, 2010). La plupart de ces protéines sont intégrées dans la membrane en des structures dites en hélice  $\alpha$ . Ces protéines sont sous forme monomérique ou forme complexe (homo ou hétéro- oligomérique) (Dalbey, Wang, & Kuhn, 2011).

### **1.1.2 - La membrane externe**

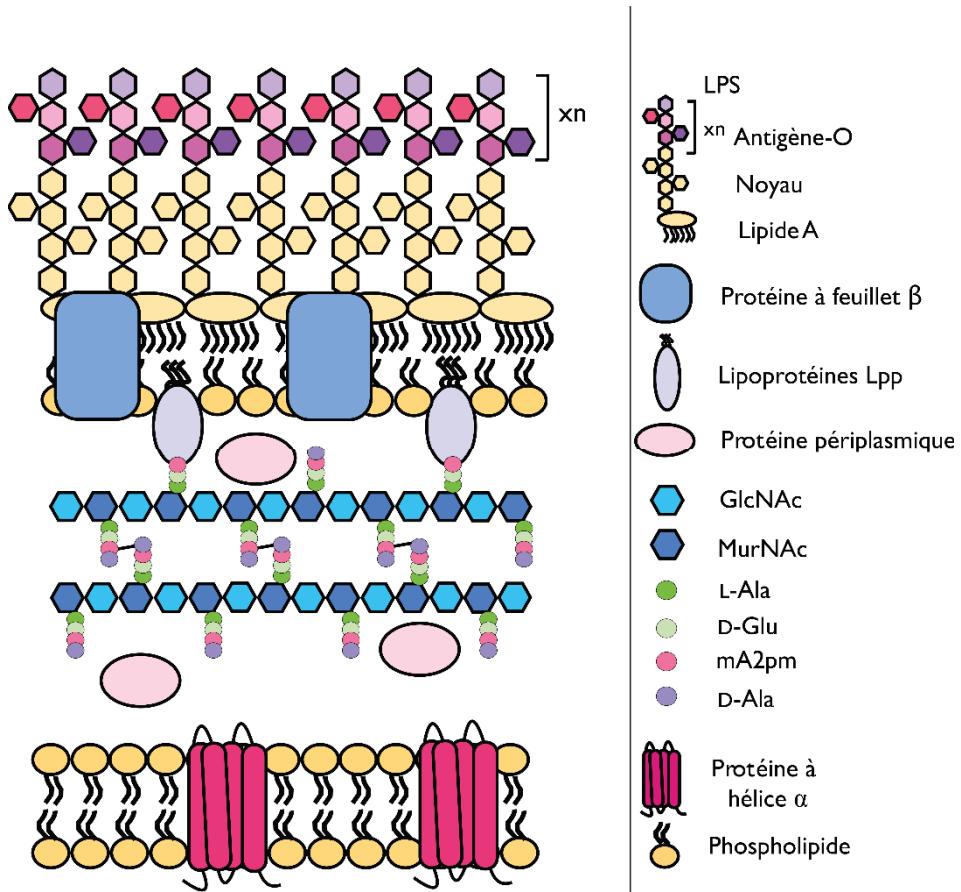
Contrairement à la membrane interne, la membrane externe est une structure asymétrique. Elle se compose de phospholipides dans son feuillett interne et de lipopolysaccharides (LPS) dans son feuillett externe (Figure 1). La composition en phospholipides est pratiquement la même que celle de la membrane interne. Le LPS constitue le feuillett externe de la membrane externe de la plupart des bactéries Gram-négatifs. Une molécule de LPS se compose de trois parties : un phospholipide de type glucosamine (lipide A), qui représente le point d'ancrage du LPS à la membrane externe; un oligosaccharide central (noyau); et une chaîne distale d'oligosaccharides répétés, dite antigène O. Le LPS détermine la charge et l'hydrophobilité de la membrane externe. Contrairement aux phospholipides typiques qui contiennent seulement deux acides gras saturés ou insaturés, le lipide A du LPS possède six acides gras saturés, ce qui le rend plus hydrophobe et confère à la membrane externe une plus grande imperméabilité (Delcour, 2009). La partie du noyau est chargée négativement ce qui génère une charge négative au LPS. Cette charge est contrebalancée et stabilisée par des cations bivalents comme le magnésium ou le calcium (Holst, 2007).

Les protéines de la membrane externe présentent des domaines transmembranaires organisés en feuillets-β, et assemblés en une structure dite en baril-β (β-barrel). Jusqu'à présent, ce type de protéines membranaires a été identifié spécifiquement dans la membrane externe des bactéries Gram-négatifs. Elles sont constituées d'environ 8-26 chaînes β organisées en nombre paire et en motifs antiparallèles (Fairman, Noinaj, & Buchanan, 2011). Les protéines les plus abondantes dans la membrane externe sont les porines, qui forment des canaux permettant un transport passif mais sélectif des molécules avec une masse moléculaire pouvant aller jusqu'à environ 600 Da (Bos, Robert, & Tommassen, 2007; Schulz, 2002). On trouve aussi dans la membrane externe une centaine de différentes lipoprotéines. Elles sont présentes dans l'une des deux surfaces de la membrane externe. Chez *E. coli*, les plus abondantes sont les lipoprotéines de Braun (Lpp), avec plus de 500 000 molécules par cellule. Les Lpp sont présents dans la face interne de la membrane externe et sont attachées au PG par leur fragment protéique et à la membrane externe par leur fragment lipidique (Braun & Silhavy, 2002; Silhavy et al., 2010).

### **1.1.3 - La paroi et l'espace périplasmique**

La paroi des bactéries Gram-négatifs est composée principalement d'une fine couche de PG à laquelle sont attachées de manière covalente les lipoprotéines (Lpp) de la membrane externe (Figure 1). Le peptidoglycane est une macromolécule glycopeptidique faite de sous-unités répétitives, appelées muropeptides, formant de longues chaînes glycane, liées entre elles par des liaisons peptidiques. Le nombre moyen de muropeptides dans une chaîne glycane est d'environ 25 à 40 unités (Glauner, Holtje, & Schwarz, 1988). Chaque unité muropeptidique est composée de deux disaccharides : le N-acétylglycosamine (GlcNAc) et l'acide N-acétylmuramique (MurNAc). À ce dernier est attachée une chaîne pentapeptidique. Chez la plupart des bactéries Gram-négatifs, la séquence initiale du pentapeptidique est (L)-Ala-(D)-Glu-(y)(meso)-Dap-(D)-Ala-(D)-Ala (de Pedro & Cava, 2015; Vollmer & Bertsche, 2008).

Le PG est localisé au niveau de l'espace périplasmique qui est défini comme un compartiment visqueux délimité par la membrane interne et externe. Comparativement au cytoplasme, le périplasme est un environnement oxydant (Depuydt et al., 2009). La composition du périplasme diffère selon l'environnement qui entoure la bactérie. Il contient plusieurs sortes de molécules, comme des acides aminés ou des oligosaccharides, et plus de 300 protéines solubles, parmi lesquelles de nombreuses enzymes et chaperonnes ainsi que des protéines impliquées dans le transport de composés vitaux pour la cellule (Markiewicz, 1989; Weiner & Li, 2008).



**Figure 1. Représentation schématique de l'architecture et de la composition de l'enveloppe des bactéries à Gram-négatif.** L'enveloppe est composée d'une membrane interne et externe, entre les deux se trouve une mince couche de paroi. La paroi est composée essentiellement de peptidoglycane auquel sont liées des lipoprotéines Lpp. L'espace entre les deux membranes est appelé périplasme. La membrane interne est composée d'une bicouche de phospholipides et de protéines avec des hélices  $\alpha$ . Le feuillet interne de la membrane externe est composé de phospholipides alors que le feuillet externe est fait de lipopolysaccharides (LPS). Dans la membrane externe se trouvent aussi des protéines repliées en feuillets  $\beta$ . Cette figure est tirée et modifiée de Dufresne & Paradis-Bleau, 2015

## 1.2 - Les mécanismes de biosynthèse et d'assemblage de l'enveloppe chez *E. coli*

Les composants de l'enveloppe sont synthétisés au niveau du cytoplasme ou de la membrane interne. Afin de d'atteindre leur destination finale ces composants doivent être sécrétés à partir du cytoplasme, transloqués à travers la membrane interne, et transportés dans le périplasme ou bien même insérés au niveau des membranes. Plusieurs mécanismes de transport et d'assemblage des composants de l'enveloppe ont émergé chez la bactérie afin

d'assurer l'intégrité de ce compartiment. Durant ces vingt dernières années, la plupart des mécanismes d'assemblage de l'enveloppe ont été identifiés et caractérisés. Dans cette section, nous allons décrire ces mécanismes chez *E. coli*.

### 1.2.1 - Les systèmes de sécrétion des protéines à travers la membrane interne

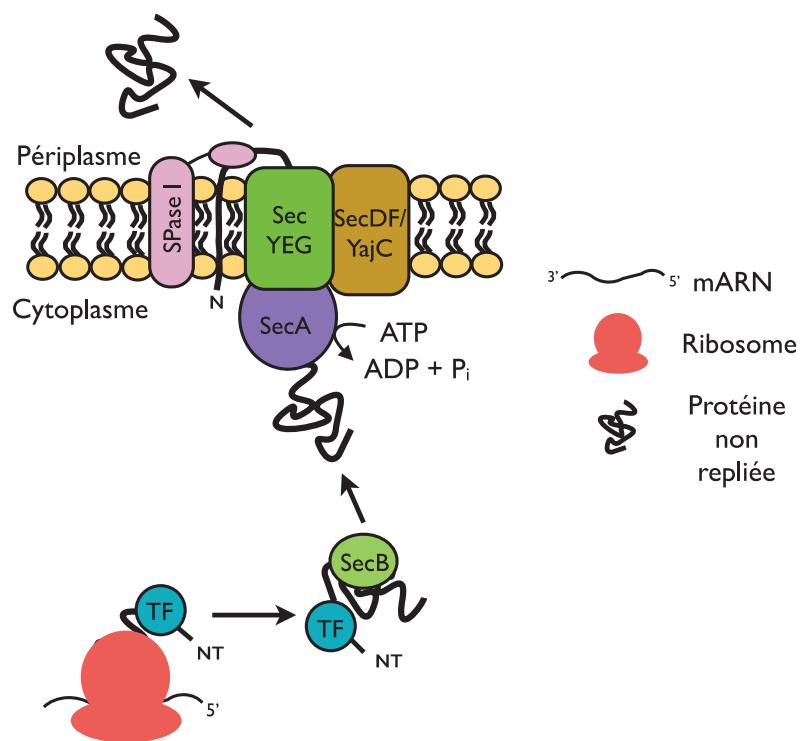
#### 1.2.1.1 - Le système Sec

Toutes les protéines sont synthétisées au niveau du cytoplasme. Les protéines de l'enveloppe doivent donc traverser la membrane interne. Pour ce faire, la plupart de ces protéines utilisent le système général de sécrétion bactérienne, Sec (Figure 2). Les protéines, qui utilisent ce mode de sécrétion, sont sous leurs formes non repliées et possèdent une séquence N-terminal spécifiquement reconnue par les composants de ce système. Le système de sécrétion Sec est composé de protéines cytoplasmiques et de protéines de la membrane interne. Les protéines membranaires SecYEG forment un canal dans la membrane interne que l'on appelle translocon. À ce canal s'associe le complexe accessoire SecDF/YajC afin de faciliter la translocation. Dans certains cas, le complexe Sec implique la protéine périphérique adénosine triphosphatese (ATPase), SecA, qui est attachée au côté cytoplasmique de la membrane interne (de Keyzer, van der Does, & Driesssen, 2003; du Plessis, Nouwen, & Driesssen, 2011).

La sécrétion des protéines dépendant de Sec peut se faire par deux modes : le mode co-traductionnel, c'est-à-dire couplée à la traduction des protéines; et le mode post-traductionnel, non couplée à la traduction. Le mode co-traductionnel est spécifique aux protéines dont la destination finale est l'intégration dans la membrane interne. Quant au mode post-traductionnel, il concerne les protéines qui doivent être transloquées à travers la membrane interne. Le mode co-traductionnel sera détaillé dans la section 1-2-2.

Une protéine qui doit traverser la membrane interne est reconnue juste après sa traduction par la protéine appelée Trigger Factor (TF). La protéine TF reconnaît spécifiquement le peptide signal de type I présent dans la partie N-terminale de la protéine récemment synthétisée, et prévient ainsi l'attachement de cette dernière à la ribonucléoprotéine signal recognition particule (SRP) (voir section 1-2-2) (Beck, Wu, Brunner, & Muller, 2000; Ferbitz et al., 2004). Au même moment, la protéine traduite est reconnue par la chaperonne SecB qui la maintient dans sa forme non repliée et la transporte jusqu'à l'ATPase SecA. En utilisant

l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP, la protéine attachée à SecA rentre dans le canal de translocation, formé par SecYEG, et est propulsée à l'intérieur (Chun & Randall, 1994; du Plessis et al., 2011). L'énergie produite par SecA n'est pas la seule utilisée lors de la translocation. En effet, les deux protéines membranaires SecF et SecD utilisent l'énergie du gradient de proton afin d'augmenter l'efficacité de la translocation (J. A. Pogliano & Beckwith, 1994; Tsukazaki et al., 2011). Le peptide signal de la protéine est clivé par la peptidase de type I, LepB, et la protéine est libérée dans le périplasme où elle est par la suite repliée par des chaperonnes et d'autres enzymes (voir section 1-3) (Aulakh, Kim, & Paetzel, 2015).

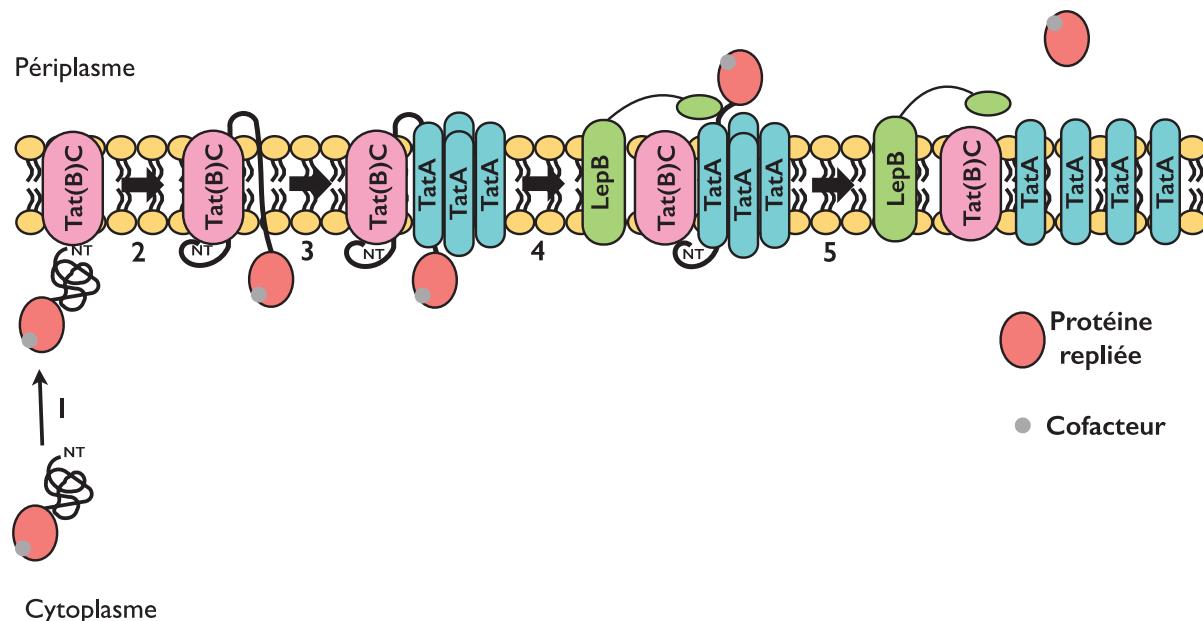


**Figure 2. Sécrétion des protéines de l'enveloppe par le système Sec selon le mode post-traductionnel.** Le trigger factor (TF) se lie à la séquence signal en N-terminale de la protéine non repliée quand elle sort du ribosome. La séquence N-terminale est aussi reconnue par SecA. La chaperonne SecB maintient la protéine traduite sous sa forme non repliée et la transporte jusqu'à SecA. L'ATPase SecA conduit le transport de la protéine à travers le translocon SecYEG en utilisant l'énergie produite par l'hydrolyse de l'ATP. Le complexe SecDF\YajC s'associe au translocon SecYEG et augmente l'efficacité du transport. Le peptide signal en N-terminal de la protéine rentre dans le canal, puis il est inséré dans la membrane interne. La signal peptidase SPase I clive le peptide signal et libère la protéine mature non repliée dans le périplasme. Figure tirée et modifiée de Dufresne & Paradis-Bleau, 2015.

### **1.2.1.2 - Le système Tat**

Le système Twin-arginine-translocation (Tat) est le seul système capable de sécréter des protéines repliées et des protéines liées à des cofacteurs cytoplasmiques (Figure 3). Ces protéines sont globulaires et nécessitent un plus grand pore que celui du canal SecYEG. Le système Tat reconnaît les protéines présentant un peptide signal de type I dans leur partie N-terminale comme pour le système SecYEG. En revanche, le peptide signal de Tat présente quelques distinctions : il est plus long et moins hydrophobe que celui de Sec; et il contient une séquence consensus avec deux résidus twin-arginines essentiels pour la reconnaissance de la protéine par Tat (Chaddock et al., 1995; Natale, Bruser, & Driessens, 2008). Cependant, les protéines, qui ont besoin du système Tat pour leur translocation, n'ont pas toutes ce peptide signal. Dans ce cas, ces protéines sont associées à une autre protéine qui contient le peptide signal de Tat. En plus de la séquence signal, les protéines doivent adopter la bonne conformation et/ou être associées à leur cofacteur pour pouvoir être reconnues par le système Tat (Berks, Palmer, & Sargent, 2005).

Le système Tat est composé de trois protéines membranaires : TatA, TatB et TatC. La protéine TatA est responsable de la formation d'un pore dans la membrane interne. TatB-C sont responsables de la reconnaissance du substrat et de l'initiation de la translocation. TatC reconnaît le peptide signal et se lie à la séquence consensus de la protéine repliée ou de son cofacteur; avec l'aide de TatB et de l'énergie du gradient de proton, TatC insère la séquence signal de Tat dans la membrane interne. La formation du complexe TatB-TatC-substrat déclenche le recrutement du monomère TatA, son oligomérisation et la formation du pore par lequel le substrat est transloqué. Par la suite, la séquence signal, qui se retrouve dans le côté externe de la membrane interne, est clivée par la peptidase LepB. Le substrat est relâché dans le périplasme, et le complexe Tat est désassocié (Goosens, Monteferrante, & van Dijl, 2014; Natale et al., 2008).



**Figure 3. Translocation des protéines repliées ou associées à un cofacteur à travers la membrane interne par le système Tat.** Le système Twin-arginine-translocation (Tat) permet la translocation de protéines repliées et/ou de protéines liées à leur cofacteur cytoplasmique à travers un large pore dans la membrane interne. La séquence de reconnaissance en N-terminal du substrat est reconnue par le complexe membranaire TatBC. Ce dernier insert la séquence signal du substrat dans la membrane interne, et recrute TatA qui oligomérise et forme un large pore dans la membrane interne pour le transport de la protéine. Suite à la translocation du substrat, la séquence signal en N-terminal est clivée par la séquence signal peptidase SPase I. Par la suite, le substrat est libéré dans le périplasme, et le complexe Tat est dissocié. Figure tirée et modifiée de Dufresne & Paradis-Bleau, 2015.

### 1.2.2- Les mécanismes d'intégration des protéines dans la membrane interne

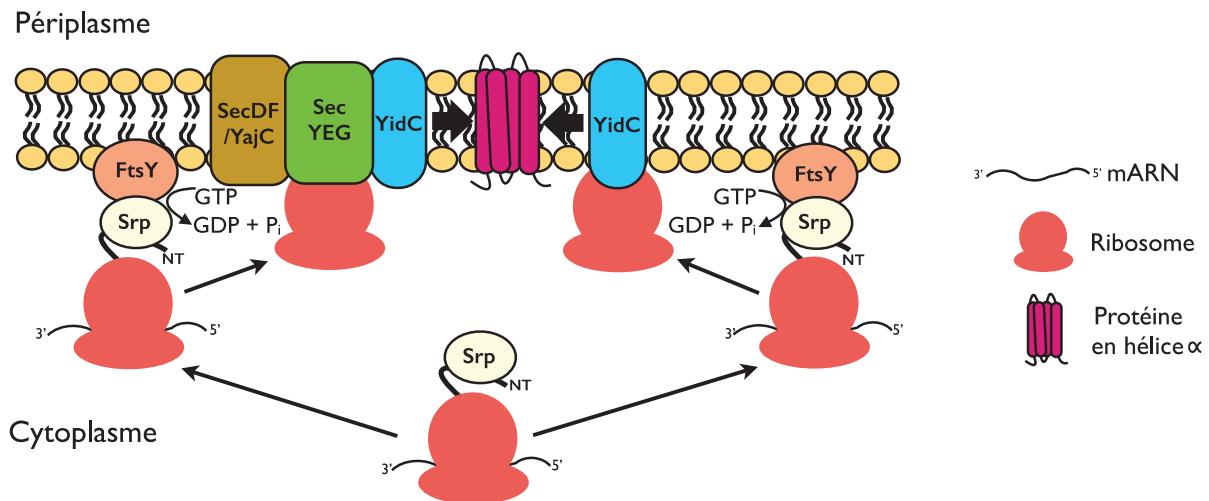
Les protéines de la membrane interne contiennent des domaines transmembranaires hydrophobes, formant des hélices  $\alpha$  qui doivent être insérées perpendiculairement dans la membrane. En raison de la présence de ces domaines hydrophobes, la protéine traduite dans le cytoplasme ne peut pas se retrouver directement en contact avec le milieu hydrophile du cytoplasme. De ce fait, le transport et l'insertion d'une protéine membranaire se font par un mode co-traductionnel (Figure 4).

Les protéines de la membrane interne contiennent un domaine transmembranaire hydrophobe en N-terminal. Lorsque la protéine est en cours de traduction, ce domaine est rapidement reconnu par la ribonucléoprotéine SRP (Berndt, Oellerer, Zhang, Johnson, &

Rospert, 2009; Maier et al., 2008). Une fois fixée au domaine transmembranaire, la SRP dirige le complexe SRP/protéine naissante/ribosome vers le récepteur de la SRP, FtsY. Ce dernier est une protéine cytoplasmique qui se fixe aux phospholipides de la membrane interne et interagit avec le complexe SecYEG. FtsY transfère le complexe protéine naissante/ribosome de la SRP au complexe d'intégration membranaire Sec, en utilisant l'énergie produite par l'hydrolyse du GTP par les deux protéines SRP et FtsY (Angelini, Deitermann, & Koch, 2005; Dalbey et al., 2011). La protéine naissante, transférée au complexe Sec, continue à être traduite. La force de traduction, produite par le ribosome, libère l'énergie nécessaire pour le passage de la protéine dans le canal SecYEG. Par la suite, la protéine est insérée et repliée dans la membrane interne par l'insertase YidC, assistée par le complexe membranaire SecDF\YajC (Komar et al., 2016; Nouwen & Driessen, 2002).

Les protéines membranaires, qui contiennent un large domaine périplasmique soluble, nécessitent l'implication de l'ATPase SecA pour la translocation de ce domaine à travers le canal SecYEG jusqu'au périplasme (du Plessis et al., 2011; Muller, Kissling, & Kockott, 2000).

Certaines protéines de la membrane interne peuvent être insérées directement par l'insertase YidC et ne passent pas par le système Sec (Figure 4). Comme pour le système d'insertion Sec dépendant, la protéine membranaire naissante est reconnue par la SRP, et le complexe est ensuite transféré à FtsY. Cependant, dans ce cas, FtsY transfère le complexe protéine naissante/ribosome directement à l'insertase YidC. La protéine est, par la suite, insérée et repliée dans la membrane par YidC en utilisant l'énergie de la force de traduction (Dalbey et al., 2011; du Plessis et al., 2011).



**Figure 4. Insertion des protéines dans la membrane interne.** Une grande partie des protéines de la membrane interne sont insérées dans la membrane par le système Sec d'une manière co-traductionnelle. La SRP reconnaît la partie hydrophobe en N-terminal du polypeptide naissant attachée au ribosome. L'interaction entre la SRP et son récepteur FtsY induit l'activité GTPase des deux protéines; l'hydrolyse du GTP conduit le transport du complexe ribosome/protéine naissante jusqu' au complexe SecYEG. L'insertion de la protéine dans la membrane interne est conduite par l'énergie produite lors de l'elongation de la chaîne peptidique du ribosome. Le complexe SecDF/YajC et l'insertase YidC interagissent avec SecYEG et contribuent à l'insertion et le repliement de la protéine dans la membrane interne. Une partie des protéines de la membrane interne est intégrée par l'insertase YidC de manière Sec indépendante. Le complexe ribosome/protéine naissante est transféré de SRP/FtsY à YidC directement pour l'insertion de la membrane interne. Figure tirée et modifiée de Dufresne & Paradis-Bleau, 2015.

### 1.2.3 - L'intégration des protéines dans la membrane externe par le système Bam

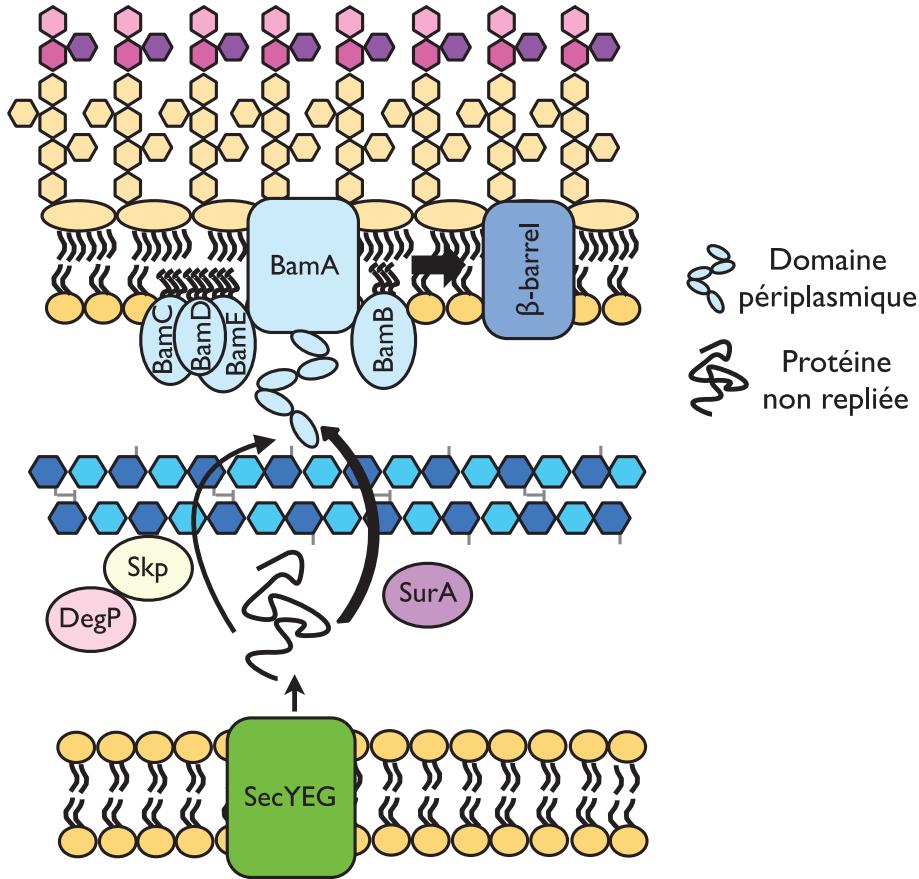
Les protéines de la membrane externe contiennent des domaines transmembranaires organisés en feuillets-β et forment une structure en baril-β. Une protéine de la membrane externe est exportée jusqu'au périplasme par le système de sécrétion Sec post-traductionnel (Figure 5). Pour ce faire, ce type de protéine contient en N-terminal le peptide signal de type I, reconnu par le Trigger Factor TF. Ces protéines sont sécrétées dans le périplasme sous leur forme non repliée, et sont associées à des chaperonnes (du Plessis et al., 2011; Ricci & Silhavy, 2012).

Les chaperonnes, impliquées dans le transport de ces protéines à travers le périplasme, sont SurA, Skp et DegP. La plus importante est SurA car elle transporte la majorité des protéines de la membrane externe. Les chaperonnes Skp et DegP semblent, quant à elles, intervenir dans

un mécanisme de sauvetage, en absence de SurA, ou lorsque la machinerie SurA se retrouve saturée (Sklar, Wu, Kahne, & Silhavy, 2007). Les chaperonnes transportent les protéines membranaires jusqu’au système d’intégration membranaire Bam ( $\beta$ -barrel assembly machinery), qui est responsable de leur insertion et de leur repliement dans la membrane externe.

Le système Bam est composé de la protéine membranaire BamA, qui forme un pore composé de 16 feuillets- $\beta$  dans la membrane externe, et contient un domaine périplasmique important pour la reconnaissance du domaine C-terminal de la protéine cible et pour l’interaction avec les autres composants du système. Ces composants sont les quatre lipoprotéines de la membrane externe BamBCDE qui forment un complexe oligomérique.

Le mécanisme d’insertion et de repliement des protéines de la membrane externe par le système Bam n’est pas encore connu. Cependant, deux modèles sont actuellement proposés. Le premier est basé largement sur des données de structure. Ces données suggèrent que BamA s’ouvre latéralement au niveau de la membrane externe entre le premier feuillet- $\beta$  et le dernier feuillet- $\beta$ . Ainsi, les deux feuillets- $\beta$ , non appariés de BamA, vont permettre l’entrée de la protéine non repliée à l’intérieur de la cavité de BamA et vont servir comme un gabarit pour le repliement de cette dernière (Noinaj, Kuszak, Balusek, Gumbart, & Buchanan, 2014). Le deuxième modèle suggère que le repliement des protéines de la membrane externe est effectué grâce à leurs propriétés thermodynamiques intrinsèques. En effet, les protéines de la membrane externe peuvent se replier spontanément au niveau du périplasme et à la surface interne de la membrane externe. Le rôle de BamA serait de fragiliser la membrane externe afin de faciliter l’intégration des protéines à l’intérieur de la membrane (Fleming et al., 2016). La structure de BamA montre qu’une partie de son domaine membranaire est courte et mesure environ 9-12 Å, en revanche, la partie opposée mesure environ 20 Å, ce qui entraîne une exposition des acides aminés hydrophile aux lipides de la membrane (Noinaj et al., 2014). Cette exposition pourrait fragiliser cette partie de la membrane et faciliter l’intégration des protéines repliées.



**Figure 5. Insertion des protéines dans la membrane externe par le système Bam.** La membrane externe contient des protéines qui adoptent une conformation en baril beta. Ces protéines sont transloquées du cytoplasme vers le périplasme par le système Sec. Elles sont ensuite transportées par des chaperonnes à travers le périplasme, sous leur forme non repliée, jusqu'à la machinerie Bam ( $\beta$ -barrel assembly machinery) se trouvant dans la membrane externe. Chez *E. coli*, la chaperonne SurA transporte la majorité de ces protéines à travers le périplasme, alors que Skp et DegP forment un mécanisme de secours. Le système Bam est composé de la protéine de la membrane externe BamA, qui contient cinq domaines périplasmiques et quatre lipoprotéines BamBCDE. Le mécanisme, par lequel sont insérées et repliées les protéines dans la membrane externe, n'est pas bien connu. Figure tirée et modifiée de Dufresne & Paradis-Bleau, 2015.

#### 1.2.4 - La biosynthèse et l'export des lipoprotéines

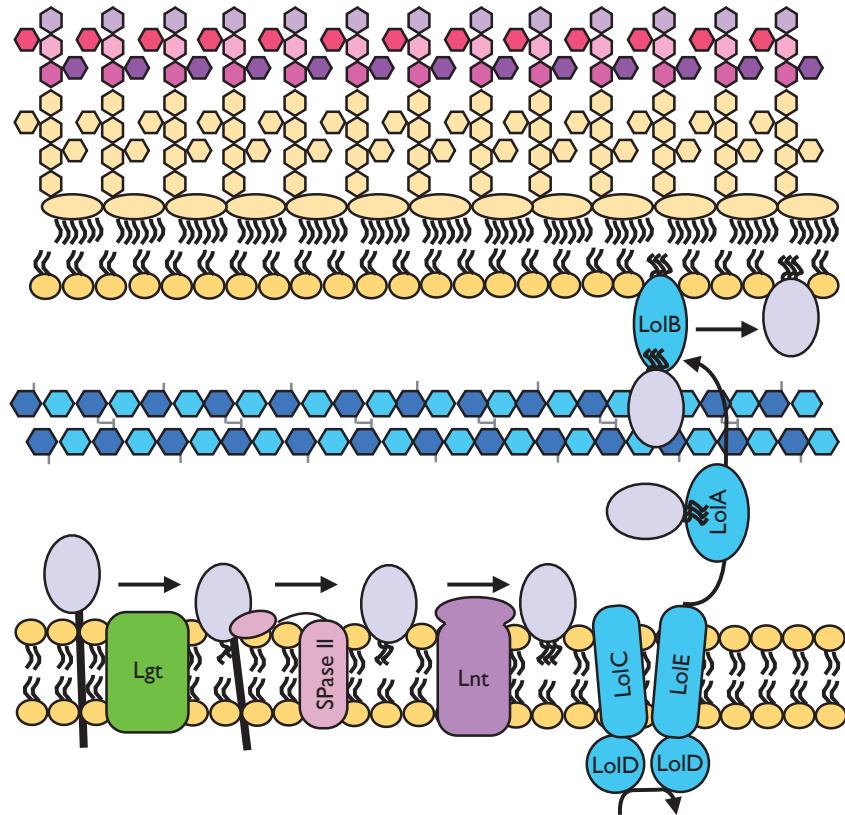
Les lipoprotéines sont attachées de façon covalente aux phospholipides de la membrane interne ou externe. Les lipoprotéines sont synthétisées dans le cytoplasme puis lipidées au niveau de la membrane interne (Figure 6). Elles sont transportées à travers la membrane interne

par le système Sec post-traductionnel. Certaines lipoprotéines peuvent aussi être transportées par le système Tat (du Plessis et al., 2011; Palmer & Berks, 2012).

Les lipoprotéines présentent dans leur partie N-terminal un peptide signal de type II qui ressemble au peptide signal de sécrétion de type I, mais il contient aussi une lipoBox présentant un site de clivage par la peptidase de type II, LspA, et d'une cystéine pour la lipidation ainsi qu'une séquence consensus.

Une fois transportée à la face externe de la membrane interne, la protéine est lipidée par la transférase Lgt qui forme un lien entre la cystéine de la lipobox et un groupement diacyglycérol. Le peptide signal est clivé par LspA et la cystéine devient le premier acide aminé de la protéine. La maturation de la lipoprotéine est complétée lors de l'ajout d'un acide gras supplémentaire par la transacylase Lnt (Palmer & Berks, 2012; Sankaran & Wu, 1994).

La lipoprotéine peut rester au niveau de la membrane interne ou être transportée par le système Lol (Localisation of lipoprotein) à la membrane externe (Figure 6). Si l'acide aminé suivant la cystéine est une aspartate, la lipoprotéine n'est pas reconnue par le système Lol et reste donc dans la membrane interne. Cependant, si le second acide aminé est autre qu'une aspartate, la lipoprotéine est transportée par le système Lol et incorporée dans la membrane externe. Le système Lol est composé des protéines LolC, LolD, et LolE qui forment un transporteur de type ABC (ATP-binding cassette) dans la membrane interne ainsi que de la chaperonne périplasmique LolA et de la lipoprotéine LolB dans la membrane externe. Le transporteur LolCDE reconnaît les lipoprotéines avec un acide aminé autre qu'une aspartate après la cystéine et transfère les lipoprotéines à la chaperonne périplasmique LolA. La chaperonne LolA transporte les lipoprotéines à travers le périplasme et les transfère à LolB qui l'insère dans la membrane externe par un mécanisme pas encore compris (Narita & Tokuda, 2010).



**Figure 6. La biosynthèse des lipoprotéines et le transport par le système Lol.** Les lipoprotéines sont des protéines lipidées et insérées dans la couche lipidique. Les lipoprotéines se retrouvent dans la facette externe de la membrane interne ou dans la facette interne de la membrane externe. Les Préprolipoprotéines sont transloquées à travers membrane interne par le système Sec ou Tat. Leur séquence N-terminal les retient dans la membrane interne après la translocation. La cystéine en C-terminal dans la séquence signal en N-terminal est lipidée avec un diacylglycérol par l'enzyme Lgt. La séquence signal en N-terminal est clivée par la signal peptidase SPase II. Par la suite, un autre acide gras est aussi attaché à la même cystéine par l'enzyme Lnt. En fonction de l'acide aminé suivant la cystéine, la lipoprotéine reste attachée à la facette externe de la membrane interne ou est transférée vers la facette interne de la membrane externe par le système Lol. Le transport des lipoprotéines se fait par le complexe LolCDE qui forme un transporteur ABC (ATP-binding cassette) dans la membrane interne, et transfère la lipoprotéine à LolA. Cette chaperonne transporte les lipoprotéines à travers le périplasme et les transferts à LolB pour leur incorporation dans le feuillet interne de la membrane externe. Figure tirée et modifiée de Dufresne & Paradis-Bleau, 2015.

#### 1.2.5 - L’assemblage et le transport des lipopolysaccharides

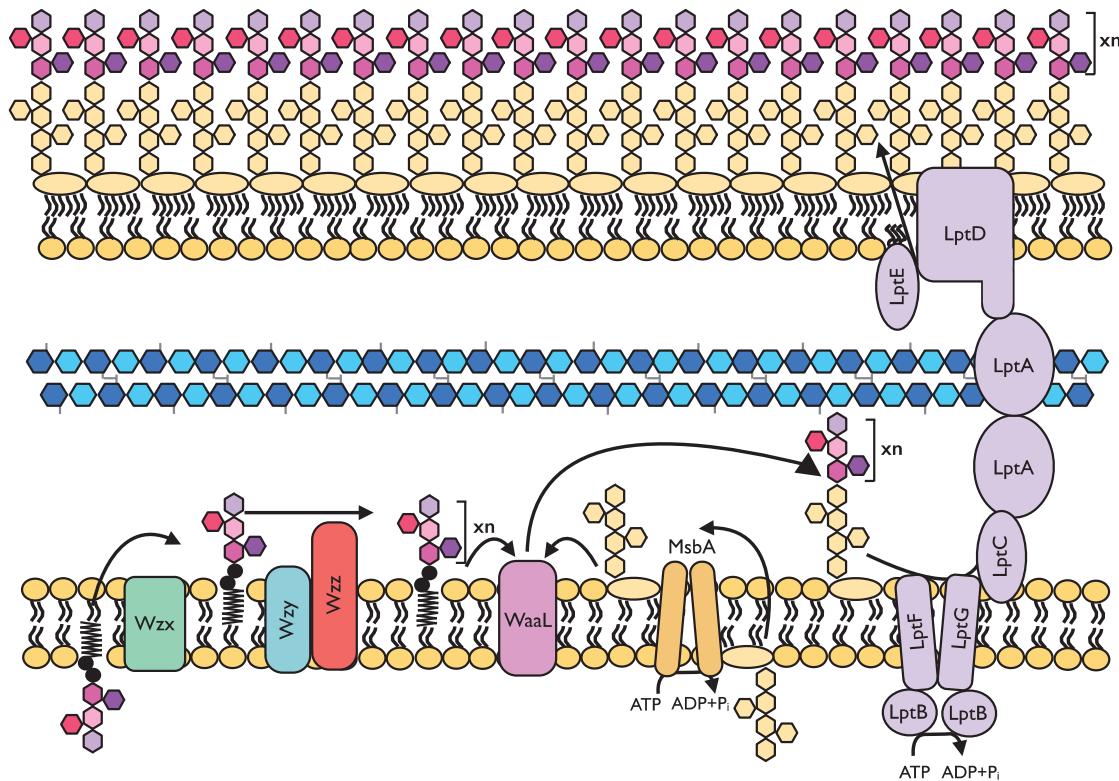
Le LPS est une molécule glycolipidique chargée négativement et composée d'un lipide A, d'un oligosaccharide central (core), et d'une chaîne distale d'oligosaccharides répétés, dite

antigène O (voir section. 1-1-2). Les molécules de LPS sont synthétisées en deux segments dans la facette interne de la membrane interne, le lipide A-core et l'antigène O (Figure 7).

Le lipide A est synthétisé dans la facette interne de la membrane interne. Ensuite, le core saccharidique est ajouté au lipide A par une série de réactions de transglycosylations cytoplasmiques pour former l'unité lipide A-core. Le lipide A-core est transporté de la surface interne à la surface externe de la membrane interne par le transporteur de type ABC, MsbA (King & Sharom, 2012; Polissi & Sperandeo, 2014).

Les unités d'antigène O sont synthétisées dans le cytoplasme, puis elles sont ajoutées individuellement au transporteur lipidique undécarpenyl-phosphate (Und-P) dans la facette interne de la membrane interne par la transférase WecA. Les unités d'antigène O liées au transporteur lipidique sont transloquées de la facette interne de la membrane interne vers la facette externe de cette membrane par la flippase Wzx. Les unités individuelles d'antigène O, transportées à la surface externe de la membrane interne, sont assemblées en un polymère d'antigènes O sur un seul transporteur lipidique par la polymérase Wzy et le facteur Wzz qui contrôle la longueur des polymères. Par la suite, le polymère d'antigène O est transféré d'Und-P à la portion lipide A-core, dans la surface externe de la membrane interne, par la ligase WaaL.

Une fois le LPS assemblé, il est transporté à la surface externe de la membrane externe par le système Lpt (lipopolysaccharide transport system) (Figure 7). Ce système, composé des protéines LptB, LptF et LptG, forme un transporteur de type ABC qui transfère le LPS de la membrane interne au périplasme en utilisant l'énergie extraite de l'hydrolyse de l'ATP dans le cytoplasme. La protéine membranaire LptC est associée au système ABC et transfère le LPS à la protéine périplasmique LptA, qui transporte le LPS à travers le périplasme. Le LPS est, par la suite, transféré à la protéine de la membrane externe LptD; elle forme alors un pore qui transporte le LPS vers la surface externe de la membrane externe avec l'aide de la lipoprotéine LptE qui lie le LPS (Okuda, Freinkman, & Kahne, 2012; Polissi & Sperandeo, 2014).



**Figure 7. L’assemblage des LPS et leur transport vers la membrane externe.** La facette externe de la membrane externe est composée principalement de LPS : un glycopolymère anionique, composé d’un lipide A; un core oligosaccharidique; et une chaîne très variable, composée d’une répétition d’oligosaccharides dits antigènes O. Les unités de lipide A-core et d’antigène O sont synthétisées séparément dans le feuillet interne de la membrane interne et sont combinées dans le feuillet externe de la membrane interne. Le lipide A-core est transloqué du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane interne par la flippase MsbA. Les sous-unités de l’antigène O sont liées au lipide transporteur dans la facette interne de la membrane interne, puis ils sont transportés dans la facette externe de la membrane interne par la flippase Wzx. Les sous-unités de l’antigène O sont par la suite assemblées en un antigène O mature par la polymérase Wzy; la longueur de la chaîne est régulée par le régulateur Wzz dans le périplasme. L’antigène O mature est transféré sur le lipide A-core par la ligase Waal. Le LPS mature est transporté vers le feuillet externe de la membrane externe par le système Lpt. Ce système inclut sept protéines LptA-G qui interagissent pour transporter le LPS à travers la totalité du compartiment de l’enveloppe. Les protéines LptBFG forment un transporteur ABC dans la membrane interne et s’associent avec la protéine LptC. Le complexe LptBCFG extrait le LPS de la membrane interne et le transfert à LptA qui le transporte à travers le périplasme. La protéine de la membrane externe LptD et la lipoprotéine LptE forment un complexe pour l’incorporation et l’assemblage du LPS par un mécanisme encore inconnu. Figure tirée et modifiée de Dufresne & Paradis-Bleau, 2015.

## **1.2.6 - La construction du polymère de peptidoglycane**

Le peptidoglycane est un composant essentiel à la viabilité de la bactérie. Il protège la bactérie des variations de la pression osmotique et lui confère sa forme cellulaire. Durant la croissance et la division cellulaire, des sous-unités du PG sont synthétisées et insérées dans le polymère de PG par une variété d'enzymes. Afin d'intégrer le nouveau matériel il est nécessaire de cliver le PG préexistant. Pour ce faire, la majorité des bactéries ont une multitude d'hydrolases qui clivent les liaisons covalentes du polymère de PG.

### **1.2.6.1 - La biosynthèse du peptidoglycane**

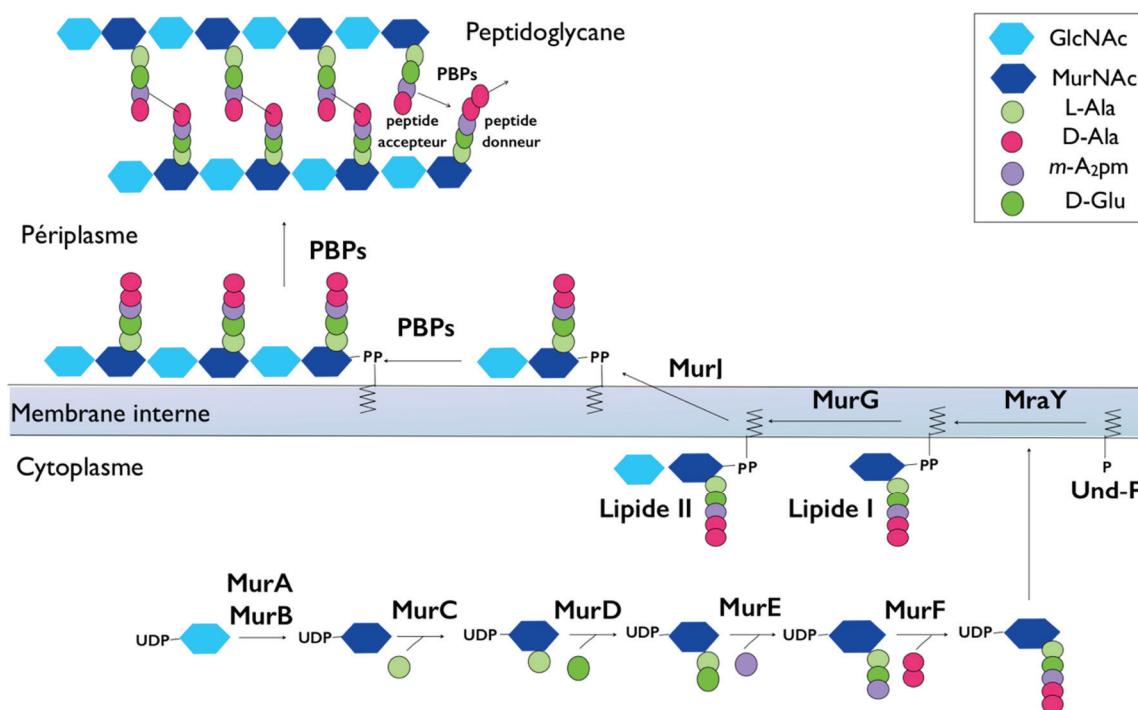
La biosynthèse du PG est réalisée en trois étapes. Chaque étape est localisée dans un compartiment différent (Figure 8). La biosynthèse débute dans le cytoplasme par la formation du UDP-MurNAc à partir de UDP-GlcNAc, impliquant la transférase MurA et la réductase MurB. Les enzymes Mur ligases, MurC, MurD, MurE et MurF rajoutent, de manière successive, les acides aminés, L-alanine, D-glutamine, l'acide méso-diaminopémilique, et le dipeptide D-alanine-D-alanine. La formation du pentapeptide se fait par la formation de liaisons peptidiques non ribosomales, nécessitant l'énergie chimique (ATP) (van Heijenoort, 2001; Vollmer & Bertsche, 2008).

La deuxième étape de la biosynthèse se déroule au niveau de la facette interne de la membrane interne. Le précurseur du PG, UDP-MurNac est transféré au transporteur membranaire de nature lipidique Und-P par l'enzyme MraY, formant ainsi le lipide I. MurG rajoute par la suite le GlcNAc au lipide I pour former le lipide II. Ce précurseur membranaire du PG est transféré de la facette interne à la facette externe de la membrane interne par la flippase MurJ (Sham et al., 2014; Vollmer & Bertsche, 2008).

La dernière étape, qui est l'étape de l'assemblage du PG, se déroule dans la facette externe de la membrane interne et dans le périplasme. Les PBPs (Penicilline Binding P

Chez les Protéobactéries comme *E. coli*, l'activation des PBPs bifonctionnels requiert leurs interactions avec les cofacteurs lipoprotéiques (Lpo) de la membrane externe (Paradis-

Bleau et al., 2010; Typas et al., 2010) (Voir section 1-2-6-2). La réaction de GTase est énergisée par le clivage de la liaison entre le phosphodiester-MurNAc du lipide II, résultant de la formation du polymère de la chaîne de sucre et de la libération du undécaprényl pyrophosphate (Und-PP). La dernière étape de l'assemblage du PG utilise l'activité D,D-transpeptidase des PBPs pour attacher la nouvelle chaîne glycane au PG déjà existant. Elle consiste à former des liaisons peptidiques entre le 4<sup>ème</sup> acide aminé (D-ala) de la chaîne peptidique du muropeptide donneur avec le 3<sup>ème</sup> acide aminé (*m*A<sub>2pm</sub>) de la chaîne peptidique du muropeptide récepteur. Cette réaction est effectuée grâce à l'énergie libérée suite au clivage de la liaison peptidique entre les derniers résidus D-ala-D-ala de la chaîne peptidique (Sauvage, Kerff, Terrak, Ayala, & Charlier, 2008; Vollmer & Bertsche, 2008).



**Figure 8. Schéma représentatif de l'étape cytoplasmique, membranaire et périplasmique de la biosynthèse du peptidoglycane.** Au niveau du cytoplasme, MurA et MurB synthétisent le UDP-MurNAc à partir de l'UDP-GlcNAc. Par la suite, les enzymes Mur ligases MurC, MurE, MurD et MurF rajoutent la chaîne pentapeptidique et forment le précurseur cytoplasmique UDP-MurNAc-pentapeptide. Au niveau de la membrane, MraY transfère le précurseur cytoplasmique au transporteur lipidique undécaprényl phosphate (Und-P) pour former le Lipide I. Ensuite, MurG rajoute le GlcNAc au Lipide I et forme ainsi le Lipide II. Ce dernier est alors transloqué dans la facette externe de la membrane interne par la flippase MurJ. L'assemblage du PG est effectué par l'activité glycosyl transférase et transpeptidation de PBPs qui polymérisent les unités de Lipide II pour former une longue chaîne glycane puis attachent cette chaîne au PG déjà

existant par la formation de liaisons peptidiques. Figure tirée et modifiée de Kouidmi, Levesque, & Paradis-Bleau, 2014.

Dans le PG on retrouve aussi d'autres types de liaisons peptidiques moins abondantes que le D-Ala-*m*A<sub>2</sub>pm. Il s'agit des liaisons *m*A<sub>2</sub>pm-*m*A<sub>2</sub>pm qui sont construites par les enzymes périplasmiques L,D-transpeptidase YcbB et YnhG. Si les PBPs sont des séries transpeptidases, les L,D-transpeptidases sont, quant à elles, classifiées comme des cystéines transpeptidases du fait que leur acide aminé catalytique soit la cystéine (Magnet et al., 2007; Pisabarro, de Pedro, & Vazquez, 1985). De plus, le substrat naturel des L,D transpeptidases n'est pas le dipeptide D-ala-D-ala du PG, comme c'est le cas pour les PBPs; ces enzymes ne constituent donc pas une cible pour les β-lactames. Ainsi, dans certains cas, les L,D transpeptidases peuvent conférer à la bactérie une résistance contre ces antibiotiques en contournant l'activité des D,D-transpeptidases, sensibles aux β-lactames (Lecoq et al., 2012; Mainardi et al., 2002). Les L,D-transpeptidases sont aussi responsables de l'attachement des lipoprotéines de Braun au PG. Les protéines périplasmiques YbiS, YcfS et ErfK catalysent la formation de liaisons peptidiques entre l'acide aminé *m*A<sub>2</sub>pm de la chaîne peptidique du PG et de l'acide aminé lysine du Lpp. La formation de ces liaisons permet l'attachement de la membrane externe au PG (Magnet et al., 2007).

#### 1.2.6.2 - Les enzymes de l'assemblage du peptidoglycane

Chez *E. coli*, trois classes d'enzymes sont impliquées dans l'assemblage du PG. La classe A contient les enzymes majeurs de la synthèse du PG qui sont les PBPs bifonctionnels (PBP1A, PBP1B et PBP1C). La classe B comprend les PBPs monofonctionnels avec une activité TPase (PBP2 et PBP3). La dernière classe concerne la synthétase monofonctionnelle, MtgA, avec une activité GTase.

La fonction de la protéine PBP1C n'est jusqu'à présent pas connue. *In vitro*, cette enzyme polymérise les sous-unités de PG; en revanche, la délétion du gène *pbpC* entraîne une perte très faible de l'activité de synthèse du PG (environ 3 %), ce qui suggère que cette protéine n'a pas un rôle majeur dans la synthèse du PG, contrairement aux autres PBPs bifonctionnels (PBP1A/B) (Schiffer & Holtje, 1999). Les enzymes PBP1A et PBP1B sont codées par les gènes *mrcA* et *mrcB*, respectivement. Ces enzymes exercent une activité redondante mais essentielle pour la bactérie. La délétion d'une de ces PBPs n'a pas d'effet sur la croissance, mais la double

délétion de ces deux PBPs est létale pour la bactérie (Macheboeuf, Contreras-Martel, Job, Dideberg, & Dessen, 2006).

PBP1A/1B sont attachés à la membrane interne et possèdent deux domaines enzymatiques avec une activité GTase et TPase soluble dans le périplasme (Lovering, Safadi, & Strynadka, 2012; Typas et al., 2010). En plus de ces deux domaines, PBP1B possède un domaine non-catalytique, entre les domaines GTase et TPase, qui contient 24 % d'homologie de séquence avec un domaine retrouvé chez la protéine UvrB, dit UvrB domaine 2 homologue (UB2H) (Lovering et al., 2012). La structure de PBP1A de *E. coli* n'a pas encore été déterminée. Cependant, en se basant sur la structure de PBP1A de *Acinetobacter Baumanii*, il a été suggéré que PBP1A possède un domaine non-catalytique proche de celui de la TPase, dit ODD (Outer-membrane Docking Domain) (Typas et al., 2010).

La fonction de PBP1A et PBP1B est reliée, respectivement, à l'interaction avec les lipoprotéines de la membrane externe LpoA et LpoB. Ces dernières sont attachées à la membrane externe et présentent une partie soluble assez longue pour passer à travers les pores du PG et interagir avec PBP1A et PBP1B. La lipoprotéine LpoB interagit avec le domaine UB2H de PBP1B. Suite à cette interaction, LpoB stimule l'activité GTase de PBP1B, ce qui cause immédiatement l'augmentation de l'activité TPase (Lupoli et al., 2014). Dans le cas de l'interaction entre LpoA/PBP1A, c'est le contraire qui se produit : LpoA stimule l'activité TPase de PBP1A, ce qui entraîne l'augmentation de l'activité GTase de cette dernière. La région ODD de PBP1A est prédictive comme étant la région d'interaction avec LpoA (Typas et al., 2010).

La protéine monofonctionnel PBP2 possède une activité TPase essentielle pour la viabilité de la bactérie. L'inhibition de l'activité TPase de PBP2 par des β-lactames induit la perte de la forme des cellules et la formation de cellules ovales (Spratt, 1975). PBP2 assiste le mécanisme d'élongation du PG et l'insertion des nouvelles chaînes glycopeptidiques. Elle est impliquée dans la régulation de l'activité GTase de PBP1A (Banzhaf et al., 2012).

L'autre protéine monofonctionnelle avec une activité TPase, PBP3 (FtsI), est essentielle pour la division cellulaire. Son inhibition par des β-lactames induit la formation de filaments suivie de la lyse (Spratt, 1975). PBP3 est localisée au niveau du site de division et se compose du domaine N-terminal, dans le cytoplasme; le domaine transmembranaire, qui joue un rôle important dans la division cellulaire; ainsi que le domaine C-terminal périplasmique, qui

contient son activité TPase importante à la biosynthèse du PG au niveau du site de division (Sauvage et al., 2014).

La protéine avec une activité GTase monofonctionnelle, MtgA, n'est pas essentielle pour la cellule. *In vitro*, son activité GTase polymérise le lipide II mais sa fonction reste encore inconnue (Schiffer & Holtje, 1999).

#### 1.2.6.3- Hydrolyse du peptidoglycane

La croissance du polymère de PG ne peut pas se faire par la biosynthèse uniquement car le fait de rajouter seulement des chaînes polypeptidiques dans le PG va augmenter son épaisseur sans augmenter la surface disponible pour cette macromolécule. Pour cela, la présence d'hydrolases est nécessaire afin de former des ouvertures où le nouveau PG peut être inséré. Il existe différentes classes d'hydrolases du PG : des endopeptidases, des carboxypeptidases, des amidases, et des transglycosylases lytiques qui clivent différentes liaisons dans le PG (Figure 9). Les hydrolases sont impliquées dans la croissance du PG, son élargissement durant l'elongation cellulaire, ainsi que dans la séparation des cellules filles lors de la division. Chez *E. coli*, les synthétases et les hydrolases interagissent directement. Les synthétases construisent la couche interne du PG, lorsque les hydrolases clivent la couche externe du PG (Vollmer et al., 2008). Un des modèles proposés est que les réactions de synthèse et d'hydrolyse du PG sont coordonnées dans un complexe multiprotéique afin d'assurer que du PG soit bien inséré là où les ouvertures ont été formées par les hydrolases (Holtje, 1996).

Les DD-carboxypeptidases sont importantes pour le maintien de la forme des cellules. Ces enzymes modifient le PG en clivant la liaison peptidique entre le D-Ala-D-Ala et libèrent le dernier D-Ala de la chaîne peptidique pour former un tetrapeptide. Ce dernier ne peut plus fonctionner comme un peptide donneur pour la réaction de transpeptidation. De cette manière, le DD-carboxypeptidase régule le niveau de liens peptidiques dans le PG, ce qui semble influencer la forme des cellules (Vollmer et al., 2008).

Les hydrolases sont aussi importantes pour l'expansion du PG durant l'elongation. Afin d'insérer du nouveau matériel, il est important de créer des ruptures. Les enzymes impliquées dans ce processus ne sont pas connues. La présence de plusieurs hydrolases chez les bactéries et leur activité redondante rend difficile la caractérisation de leur rôle. Cependant, il est bien établi que les hydrolases sont essentielles durant l'elongation. En effet, durant le processus

d'elongation, les hydrolases sont très actives et libèrent des fragments du PG, qui sont par la suite recyclés par la bactérie (Goodell, 1985; Goodell & Schwarz, 1985). Par exemple, *E. coli* perd environ 40-50 % de son PG existant dans une génération résultant de l'activation d'endopeptidases, d'amidasées et de transglycosylases lytiques (Kraft, Templin, & Holtje, 1998).

La séparation des deux cellules filles lors de la division cellulaire nécessite aussi l'intervention des hydrolases qui clivent le peptidoglycane au niveau du septum. Plusieurs enzymes sont impliquées dans ce mécanisme : les amidases (AmiA, AmiB et AmiC), les transglycosylases comme MltA et slt70; les endopeptidases comme PBP4, PBP7 et MepA. La délétion d'AmiC, ou des trois amidases en même temps, aboutit à la formation de filaments comprenant 3 à 6, et plus que 20 cellules, respectivement. La délétion des amidases combinée à celle des transglycosylases ou des endopeptidases peut entraîner la formation d'un filament comprenant 100 cellules (Heidrich et al., 2001; Heidrich, Ursinus, Berger, Schwarz, & Holtje, 2002).

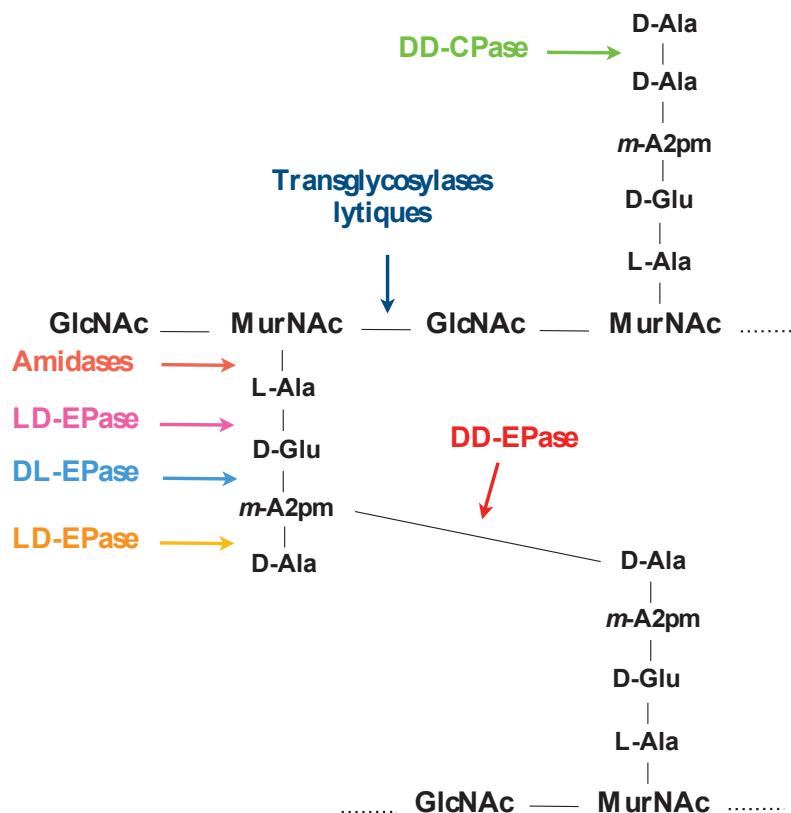
#### 1.2.6.4 - Les hydrolases du peptidoglycane et leur site de clivage

Le PG déjà existant doit être clivé ou même détaché pour assurer l'insertion de nouveaux matériaux sans perturber son intégrité et sa croissance. Ce mécanisme est effectué par des hydrolases et permet le détachement et le recyclage de 40 à 50 % du PG au cours d'une génération (Goodell & Schwarz, 1985; Vollmer et al., 2008). Chez *E. coli*, il y a environ une trentaine d'hydrolases. Ces enzymes incluent les N-acetylmuramyl-L-alanine amidases (amidasées), les N-acetylglucosaminidases, les transglycosylases lytiques, les endopeptidases (EPase) et les carboxypeptidases (CPase). Il y a des hydrolases pour presque chaque liaison peptidique ou glycosidique du PG (Figure 9) (Frirdich & Gaynor, 2013). Les hydrolases sont généralement solubles dans le périplasme ou attachées à la membrane externe. Il existe aussi quelques hydrolases dans le cytoplasme qui sont impliquées dans le recyclage des sous-unités détachées du PG comme les N-acetylglucosaminidases. Dans cette partie, nous présenterons les hydrolases localisées dans l'enveloppe.

Les amidases coupent spécifiquement la liaison amide entre le MurNAc et l'acide aminé en position 1 (L-Alanine) de la chaîne peptidique. Chez *E. coli*, il existe trois amidases périplasmique (AmiA, AmiB, AmiC) et une lipoprotéine attachée à la membrane externe (AmiD) (Vollmer et al., 2008).

Les transglycosylases lytiques d'*E. coli* sont la protéine soluble slt et les lipoprotéines MltA, MltB, MltC, MltD, MltF, MltG. Ces hydrolases clivent la liaison glycosidique  $\beta$ 1,4 entre le GlcNac et le MurNAc. Par la suite, grâce à leur résidu catalytique, l'arginine, ils déprotonisent le carbone 6 du MurNAc et ils facilitent la formation du 1,6 anhydro du MurNAc (Holtje, Mirelman, Sharon, & Schwarz, 1975; Thunnissen, Rozeboom, Kalk, & Dijkstra, 1995).

Les hydrolases qui clivent entre les liaisons peptidiques sont les endopeptidases et les carboxypeptidases. Les endopeptidases clivent une variété de liaisons peptidiques de type LD, DL et DD entre les chaînes peptidiques (Vollmer et al., 2008). En revanche, les carboxypeptidases de *E. coli* clivent les liaisons de type DD qui sont à l'extrémité C-terminale de la chaîne peptidique pour libérer le dernier acide aminé (le D-Ala en position 5) (Ghosh, Chowdhury, & Nelson, 2008). On trouve des hydrolases avec les deux activités (TPase et CPase) comme PBP4, PBP7 et AmpH. La CPase PBP5 est la plus abondante et la plus exprimée durant la phase exponentielle. Mis à part les peptidases bifonctionnelles et PBP5, le groupe des CPases inclut aussi PBP4b, PBP6 et PBP6b. Le groupe des endopeptidases inclut en plus, MepA, MepS, MepM et MepH (Frirdich & Gaynor, 2013; Ghosh et al., 2008).



**Figure 9. Les sites de coupure des hydrolases dans le peptidoglycane.** Les endopeptidases (EPases), chez *E. coli*, clivent presque tous les ponts entre les peptides de conformation DD, LD et DL. Les DD-carboxypeptidases (DD-CPases) clivent les acides aminés de conformation D en position terminale d'une chaîne peptidique. Les amidases hydrolysent les ponts entre le MurNAc et l'acide aminé L-Alanine en N-terminal de la chaîne peptidique. Les transglycolases lytiques clivent la liaison glycosidique  $\beta$ 1,4 entre le GlcNAc et le MurNAc. Les flèches indiquent les sites de coupures. Figure inspirée de Vollmer et al., 2008.

### 1.3 - Le repliement des protéines dans le périplasme

Les protéines non repliées, transportées par le système Sec et libérées dans le périplasme, sont prises en charge par différents catalyseurs et chaperonnes périplasmiques qui assistent leur repliement en une forme native et stable.

#### 1.3.1 - Formation des ponts disulfures par le système Dsb

L'espace périplasmique a un plus grand potentiel de réduction comparativement au cytoplasme. Pour cette raison, le périplasme est considéré comme un compartiment oxydant où la majorité des cystéines périplasmiques forment des ponts disulfures. Ces derniers sont

importants pour la stabilité de la protéine. Les protéines contenant des ponts disulfures ne se trouvent pratiquement que dans le périplasme. En effet, ce compartiment est favorable à la formation de ces ponts car il contient une thiol oxydase DsbA et une isomérase DsbC (Arts, Gennaris, & Collet, 2015) (Figure 10). DsbA et DsbC font partie de la famille des Dsb (Disulfide bond) qui comprend aussi les protéines DsbB, DsbD et DsbG dont le rôle sera détaillé dans les prochaines sections. Les Dsb ont un domaine thioredoxine et un motif catalytique avec deux cystéines (CXXC) (Depuydt, Messens, & Collet, 2011).

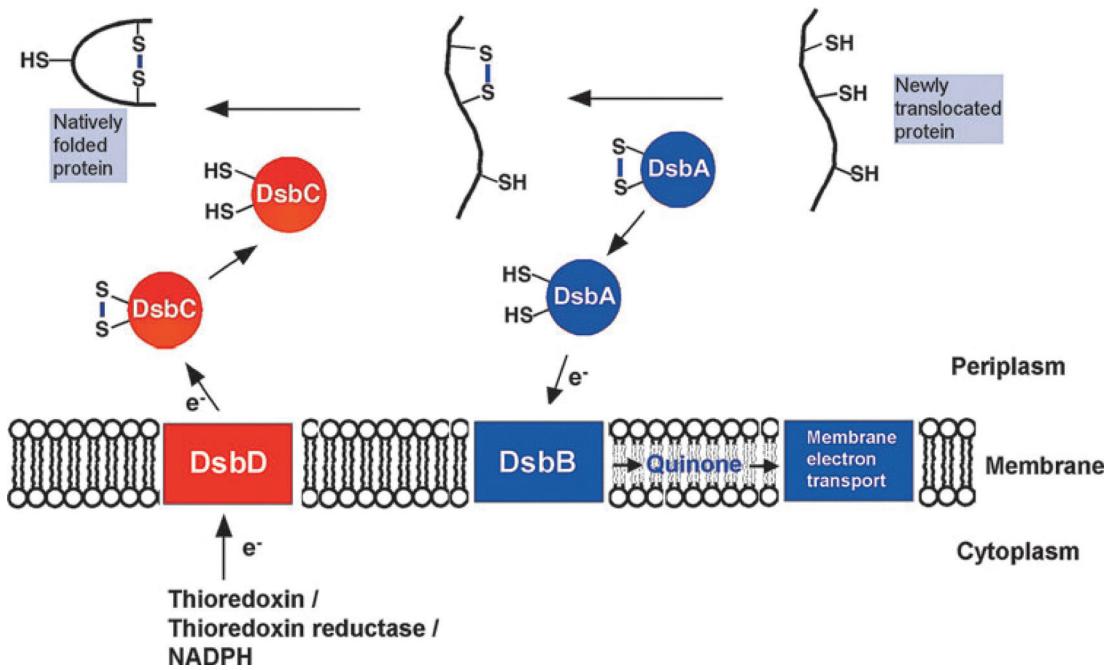
DsbA est la première protéine identifiée du système Dsb (Bardwell, McGovern, & Beckwith, 1991). Elle est sous forme monomérique soluble et oxydée dans le périplasme. Les cystéines du site actif de DsbA forment un pont disulfure très instable, ce qui confère à DsbA un potentiel redox important et une forte activité d'oxydation. DsbA oxyde les résidus de cystéines des protéines nouvellement synthétisées et libérées dans le périplasme pour former des ponts disulfures entre deux cystéines (Figure 10) (Arts et al., 2015). Cette réaction débute par une attaque nucléophile du substrat sur la première cystéine de DsbA, induisant la formation d'un pont disulfure mixte entre la cystéine du substrat et celle de DsbA. Par la suite, ce complexe est détaché après la deuxième attaque nucléophile effectuée par une autre cystéine du substrat. Cette deuxième réaction résulte dans la formation d'un pont disulfure entre les deux cystéines du substrat et la réduction des cystéines de DsbA (Arts et al., 2015; Depuydt et al., 2011).

DsbA est recyclé en sa forme oxydée par la protéine de la membrane interne DsbB (Figure 10). Cette dernière est une protéine avec six domaines transmembranaires et deux boucles périplasmiques, comportant chacune une paire de cystéines oxydées. Ces cystéines sont responsables de la perte d'électrons (oxydation) des cystéines de DsbA et de leur transport jusqu'aux quinones de la chaîne respiratoire (Missiakas, Georgopoulos, & Raina, 1993).

Certaines protéines périplasmiques contiennent plus de deux cystéines dans leur séquence. Sachant que DsbA introduit de préférence des ponts disulfures entre des cystéines successives, dans le cas où des protéines nécessitent la formation de ponts disulfures entre deux cystéines non successives, DsbA est plus susceptible d'introduire des erreurs et former des ponts disulfures non-natifs (Arts et al., 2015; Goemans, Denoncin, & Collet, 2014). Dans ce cas, les ponts disulfures non-natifs sont réparés par la protéine périplasmique DsbC. Cette protéine

possède deux fonctions, isomérase et réductase. La fonction réductase est discutée dans la section 1.4.3. DsbC forme une protéine dimérique en forme de V (V-shaped) où, dans chaque monomère, se trouve en C-terminal le motif CXXC du site actif. Contrairement à DsbA, ces cystéines sont maintenues sous leur forme réduite par la protéine de la membrane interne DsbD (Figure 10). L’association des deux monomères induit la formation d’un domaine non chargé à l’intérieur du V qui permet l’attachement du substrat (Depuydt et al., 2011).

Le mécanisme catalytique, par lequel DsbC agit comme isomérase ou comme réductase, est presque le même. La première cystéine de DsbC induit une attaque nucléophile sur le pont disulfure non-natif et entraîne la formation d’un complexe mixte entre DsbC et le substrat. Ce complexe est ensuite résolu par une deuxième attaque nucléophile d’une autre cystéine du substrat, formant ainsi un pont disulfure natif et libérant DsbC sous sa forme réduite. Contrairement, à la fonction isomérase de DsbC, sa fonction réductrice induit le relâchement de DsbC sous une forme oxydée qui nécessite son recyclage en une forme réduite par DsbD (voir section 1.4.3) (Denoncin & Collet, 2013).



**Figure 10. La formation des ponts disulfures par le système Dsb.** Les ponts disulfures sont introduits par DsbA, qui est recyclée par la protéine de la membrane interne DsbB. DsbB régénère des ponts disulfures de nouveau par la réduction des quinones. Les électrons sont, par la suite, transférés à la chaîne respiratoire. Les ponts disulfures non-natifs introduits par DsbA, chez les protéines avec plusieurs cystéines, sont corrigés par la protéine isomérase DsbC. DsbC est maintenue réduite dans le périplasme par la protéine de la membrane interne DsbD. DsbD transfère les électrons à partir du système des thioredoxines dans le cytoplasme vers le périplasme. Les flèches noires indiquent le flux d'électrons. Figure tirée de Cho & Collet, 2013.

### 1.3.2 - Isomérisation *cis-trans* des chaînes peptidiques

La plupart des chaînes peptidiques formées lors de la traduction des protéines sont sous la conformation *trans*, présente chez la majorité des protéines natives. Cependant, une exception existe pour la proline. Cet acide aminé est le seul à pouvoir adopter une conformation *cis* stable et former une liaison *cis-trans*. La formation de ces liaisons de manière naturelle prendrait beaucoup de temps. Les peptidyl-prolyl isomérasées (PPIases) sont capables d'accélérer la formation des liaisons peptidiques *cis-trans* entre un peptide et la partie N-terminal de la proline, et ainsi accélérer le repliement de la protéine. Plusieurs évidences montrent que cette isomérisation joue un rôle important dans la fonction d'une protéine (Brandl & Deber, 1986; Dunker, 1982; Langsetmo, Fuchs, & Woodward, 1989)

Chez *E. coli*, on retrouve quatre PPIases qui appartiennent à trois familles différentes : FkpA, du groupe des FKBP (FK506 binding protein); PpiA, reliée au groupe des cyclophilin; PpiD et SurA sont reliées à la famille des parulins (Scholz et al., 1998). La délétion des quatre PPIases en même temps n'induit pas de phénotype sévère, ce qui signifie que ces catalyseurs ne sont pas essentiels à la viabilité chez *E. coli* (Kleerebezem, Heutink, & Tommassen, 1995). De plus, SurA et FkpA semblent agir préférentiellement comme des chaperonnes qui assistent le repliement des protéines de la membrane externe (voir section 1-3-4). Cependant, il a été démontré, dans de récentes études, que la toxicité de la colicine M dépend de l'activité la PPIase FkpA (Helbig, Patzer, Schiene-Fischer, Zeth, & Braun, 2011).

### 1.3.3 - Le repliement des protéines par des chaperonnes

Un bon repliement des protéines nécessite la présence de chaperonnes pour assister le processus de repliement et assurer la formation d'une protéine native et fonctionnelle. De plus, elles préviennent la formation d'agrégations protéiques. Les chaperonnes reconnaissent la région hydrophobique exposée à la surface de leur substrat et s'y attachent. Contrairement au cytoplasme, le périplasme ne contient pas de molécule d'ATP qui fournit l'énergie nécessaire pour le processus de repliement des protéines. Ainsi, les chaperonnes périplasmiques se caractérisent par le fait de fonctionner en absence de source d'énergie produite par l'ATP. Dans l'enveloppe, les chaperonnes sont impliquées dans le repliement des protéines périplasmiques et de la membrane externe. Dans cette partie de l'introduction, nous allons décrire le rôle et les caractéristiques des chaperonnes impliquées dans le repliement des protéines de la membrane externe ainsi que la chaperonne Spy qui est induite lors d'un problème de repliement des protéines dans l'enveloppe.

#### 1.3.3.1 - SurA

SurA est une chaperonne périplasmique qui joue un rôle important dans le repliement des protéines de la membrane externe mais aucune étude, jusqu'à maintenant, n'a montré son implication dans le repliement des protéines périplasmiques. Le mutant *surA* présente un problème de repliement de la protéine de la membrane externe LptD (importante pour l'intégration des lipoprotéines dans la membrane externe) et de FhuA (Freinkman, Chng, & Kahne, 2011). Une analyse protéomique a montré que l'absence de SurA diminue l'abondance

de 8 protéines de la membrane externe parmi les 23 étudiées (Vertommen, Ruiz, Leverrier, Silhavy, & Collet, 2009). Une autre étude impliquant SurA dans la biogenèse des protéines de la membrane externe, montre que SurA semble avoir une forte préférence pour les peptides enrichis en résidus aromatiques avec un motif Ar-X-Ar (Ar veut dire acide aromatique). Ce motif est généralement retrouvé en C-terminal des protéines de la membrane externe (Bitto & McKay, 2003).

SurA est composée de quatre régions distinctes : un large domaine N-terminal, deux domaines PPIase, et un court domaine C-terminal. Le tout forme une structure modulaire avec une fente importante pour l'activité de la chaperonne de SurA (Bitto & McKay, 2002). L'activité PPIase n'est pas importante pour la fonction de SurA *in vivo* car, le mutant *surA* ne portant pas les deux domaines PPIase est fonctionnel. Cela signifie que l'activité PPIase de *surA* est non essentielle pour son rôle chaperonne, ou bien, elle est complémentée par d'autres PPIase (Behrens, Maier, de Cock, Schmid, & Gross, 2001). SurA interagit avec la protéine BamA impliquée dans l'intégration des protéines dans la membrane externe, ce qui signifie que SurA transfèrerait les protéines à la machinerie Bam (Bennion, Charlson, Coon, & Misra, 2010). Ces résultats indiquent que SurA est une chaperonne importante à la biogenèse des protéines de la membrane externe.

### 1.3.3.2 - Skp

Skp est une chaperonne périplasmique qui joue aussi un rôle dans le repliement des protéines de la membrane externe. La double délétion des gènes de *skp* et *surA* induit un phénotype létal; cela signifie que ces deux protéines jouent un rôle similaire (Rizzitello, Harper, & Silhavy, 2001). Il a été montré que Skp interagit avec la bicouche de phospholipides et induit un changement de conformation de la membrane qui la rend insensible aux protéases (De Cock et al., 1999). Ceci suggère que Skp interagit avec la membrane interne pour accéder aux protéines qui sont transloquées par le canal SecYEG; elle les protège ainsi des protéases et d'un repliement précoce. Il est possible que Skp interagisse avec la protéine BamA pour transférer les protéines de la membrane interne au système Bam. En revanche, aucune interaction n'a été observée entre Skp et BamA, ce qui suggère que Skp transfère probablement le substrat à SurA, qui peut par la suite le transférer à la machinerie Bam (Bos et al., 2007).

Des études montrent que Skp peut aussi être impliquée dans le repliement de protéines périplasmiques. Une analyse protéomique a montré que Skp interagit avec quelques protéines du périplasme (Jarchow, Luck, Gorg, & Skerra, 2008). De plus, la surexpression de Skp améliore la production de certaines protéines recombinantes dans le périplasme (Bothmann & Pluckthun, 1998). Ainsi, Skp semble être impliquée dans le repliement d'un plus large spectre de substrats.

### 1.3.3.3 - DegP

DegP est une sérine protéase d'*E. coli* active à 42 °C qui dégrade seulement les protéines qui sont mal repliées. Cette activité est dépendante de la sérine comme acide aminé catalytique et est essentielle à la survie de cette bactérie à haute température (Strauch, Johnson, & Beckwith, 1989). DegP joue aussi un rôle de chaperonne. Le changement entre son activité protéase et chaperonne semble être contrôlé par le changement de température. En dessous de 28 °C, DegP semble avoir une fonction de chaperonne, elle devient une protéase quand la température augmente (Sobiecka-Szkatula et al., 2009). La structure de DegP montre qu'elle est assemblée en hexamère, composé de deux trimères reliés par une boucle. Le domaine portant l'activité protéase est sur l'un des trimères. La boucle, qui relie les deux trimères, bloque la formation de la conformation active de son site actif. Une fois que la température augmente, la boucle change de conformation; ce qui suggère que ce changement est responsable du passage vers l'activité protéase (Spiess, Beil, & Ehrmann, 1999).

DegP a été impliquée dans la biogenèse des protéines de la membrane externe. La déplétion de DegP est létale dans une souche déficiente dans l'assemblage des protéines de la membrane externe, OmpC ou OmpF; alors que l'expression du mutant catalytique de DegPS<sub>S210A</sub> dans ces souches rétablie le défaut. Cette observation suggère que DegP interagit avec OmpC et OmpF pour prévenir leur agrégation (CastilloKeller & Misra, 2003; Misra, CastilloKeller, & Deng, 2000). De plus, la double mutation *degP* et *surA* est létale, ce qui suggère que ces deux protéines sont impliquées dans un mécanisme similaire (Rizzitello et al., 2001). De données récentes ont montré que DegP héberge des monomères de protéines de la membrane externe à l'intérieur de sa cavité pour les protéger de l'agrégation et des protéases pendant qu'elle les transporte dans le périplasme (Krojer et al., 2008).

#### **1.3.3.4 - FkpA**

FkpA était en premier décrite comme une cis-trans isomérase (voir section 1-3-2). Par la suite, plusieurs études ont décrit FkpA comme une chaperonne périplasmique qui assiste le repliement d'un large spectre de protéines dans l'enveloppe. FkpA chaperonne le repliement de plusieurs protéines périplasmiques indépendamment de son activité PPIase (Arie, Sassoong, & Betton, 2001). L'inactivation de FkpA induit une activation du système de réponse au stress  $\sigma^E$  ( $\sigma^E$  est un système qui est activé suite à une accumulation de protéines non repliées dans l'enveloppe) (voir section 1.5.1.1) (Missiakas, Betton, & Raina, 1996). De plus, l'inactivation de FkpA augmente la sensibilité du mutant *degP* à de hautes températures (Arie et al., 2001).

Récemment, il a été démontré que FkpA avec Skp jouent un rôle dans le repliement des protéines de la membrane externe LptD et FhuA, qui sont toutes deux dépendantes de SurA pour leur repliement. En revanche, Skp et FkpA ne sont pas capables de compléter le défaut d'assemblage de LptD et FhuA dans un mutant *surA*, ce qui suggère que FkpA et Skp jouent un rôle différent de celui de SurA dans le mécanisme de biogenèse des protéines de la membrane externe (Krojer et al., 2008).

#### **1.3.3.5 - Spy**

Spy a été récemment identifiée comme une chaperonne périplasmique suite à un criblage génétique désigné pour identifier des conditions favorisant le repliement d'une protéine instable (un variant de la protéine Im7) dans le périplasme de *E. coli*. Une augmentation massive de la production de Spy a été observée dans le périplasme suite à l'expression du variant Im7 ainsi qu'une augmentation de la stabilité de cette protéine de plus de 700 fois. Des expériences *in vitro* ont montré que Spy est une chaperonne qui rétablit d'une manière efficace l'agrégation des protéines et aide à leur repliement (Quan et al., 2011). De plus, la présence d'agents dénaturants, comme l'éthanol ou le butanol, induit une importante augmentation de la quantité de Spy dans le périplasme (Brynildsen & Liao, 2009; Rutherford et al., 2010). L'expression de *spy* est régulée par les deux systèmes de réponse aux stress Cpx et BaeR, qui sont tous les deux activés par la présence d'agrégations ou de protéines non repliées dans le périplasme (Bury-Mone et al., 2009).

Spy est une petite protéine d'environ 16 kDa qui présente une structure dimérique en forme d'un berceau « cradle ». Cette forme est différente des autres formes de chaperonne

connues jusqu'à présent. Cette forme particulière de Spy et la grande flexibilité de cette structure pourrait permettre l'attachement et le repliement de grandes protéines ainsi que leur protection aux conditions de stress (Quan et al., 2011).

## 1.4 - La protection et la réparation des cystéines de l'oxydation chez *E. coli*

L'espace périplasmique est considéré comme un compartiment avec un haut potentiel oxydant où la plupart des cystéines sont oxydées et forment des ponts disulfures importants à la stabilité des protéines. Cependant, plusieurs protéines périplasmiques contiennent une seule cystéine dans leur séquence qui est vulnérable à l'oxydation et doit être maintenue sous sa forme réduite. En plus d'être un environnement oxydant, le périplasme peut être directement exposé à des concentrations élevées de dérivés réactifs de l'oxygène, appelés ROS (Reactive Oxygen Species); ils sont soit libérés par des cellules hôtes ou d'autres bactéries pour se défendre, soit produits par la bactérie elle-même lors d'un stress oxydatif. Les ROS peuvent causer des dommages à l'ADN, aux protéines et aux lipides, ce qui peut induire la mort de la bactérie. Dans cette partie, nous allons parler du stress oxydatif, des dommages portés aux résidus cystéines des protéines, ainsi que des mécanismes de réparation des cystéines oxydées.

### 1.4.1 - La production des dérivés réactifs de l'oxygène

L'ajout d'un électron à une molécule d'oxygène entraîne la formation des dérivés réactifs de l'oxygène comme le superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le radical hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ ). Les ROS peuvent être formés de manière endogène lorsque l' $O_2$  oxyde des enzymes qui transfèrent les électrons dans la chaîne respiratoire. Le transport d'électrons, dans les conditions normales, est toujours accompagné par une production de dérivés réactifs de l'oxygène. Le taux de production des ROS dépend de la fréquence de collision de l'oxygène avec les enzymes de la chaîne respiratoire. La fréquence de collision est déterminée principalement par la concentration de l'oxygène. Afin de se protéger des ROS produits durant le processus de respiration, la bactérie utilise des enzymes antioxydantes qui transforment ces réactifs dangereux en produits moins dangereux, et ainsi les neutralisent avant qu'ils n'induisent des dommages dans la cellule. Ces enzymes sont les catalases, les peroxydases et les superoxydes dismutases (Imlay, 2003, 2013).

Chez *E. coli*, on retrouve trois superoxydes dismutases (SODs), deux dans le cytoplasme (SodA, SodB) et une dans le périplasme (SodC). La production de  $O_2^{\bullet-}$  a été détectée dans le périplasme en phase exponentielle. La charge négative de ce dérivé de l'oxygène fait qu'il ne peut pas traverser les membranes biologiques pour être neutralisé par les SODs cytoplasmiques. Ceci pourrait expliquer la présence de SodC dans le périplasme. En revanche, le  $O_2^{\bullet-}$  dans le périplasme ne semble pas être dangereux puisque l'absence de SodC n'induit pas de phénotype (Korshunov & Imlay, 2006). Les deux SODs cytoplasmiques sont produits à une concentration suffisante pour maintenir un niveau faible de  $O_2^{\bullet-}$  dans le cytoplasme (Imlay & Fridovich, 1991).

Le  $H_2O_2$  est réduit dans le cytoplasme par la peroxydase AhpCF et par les catalases KatE et KatG. La peroxydase AhpCP est très efficace pour réduire le  $H_2O_2$  produit à des concentrations physiologiques (Seaver & Imlay, 2001). Les catalases KatE et KatG servent, quant à elles, à réduire le  $H_2O_2$  lorsqu'il est produit à des concentrations plus élevées (Christman, Morgan, Jacobson, & Ames, 1985). Jusqu'à présent aucune enzyme impliquée dans la neutralisation du  $H_2O_2$  n'a été identifiée dans le périplasme d'*E. coli*. Cela peut être dû au fait que le  $H_2O_2$  peut traverser la membrane et être réduit par le système de détoxification dans le cytoplasme.

Le radical hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ ) est extrêmement réactif et c'est le seul dérivé de l'oxygène qui peut endommager pratiquement toutes les biomolécules. Il est formé durant la réaction de Fenton, par l'interaction entre une molécule de fer libre ( $Fe^{2+}$ ) et le  $H_2O_2$  (Xu & Chance, 2007). Le  $O_2^{\bullet-}$ , à lui seul, n'est pas très réactif; cependant, il peut favoriser la production de  $OH^{\bullet}$  en induisant la libération de  $Fe^{2+}$  à partir des enzymes qui ont un motif [4Fe-4S]. L'augmentation de la production de  $OH^{\bullet}$  peut aussi être la conséquence d'une dérégulation du niveau de fer dans la cellule (Touati, 2000).

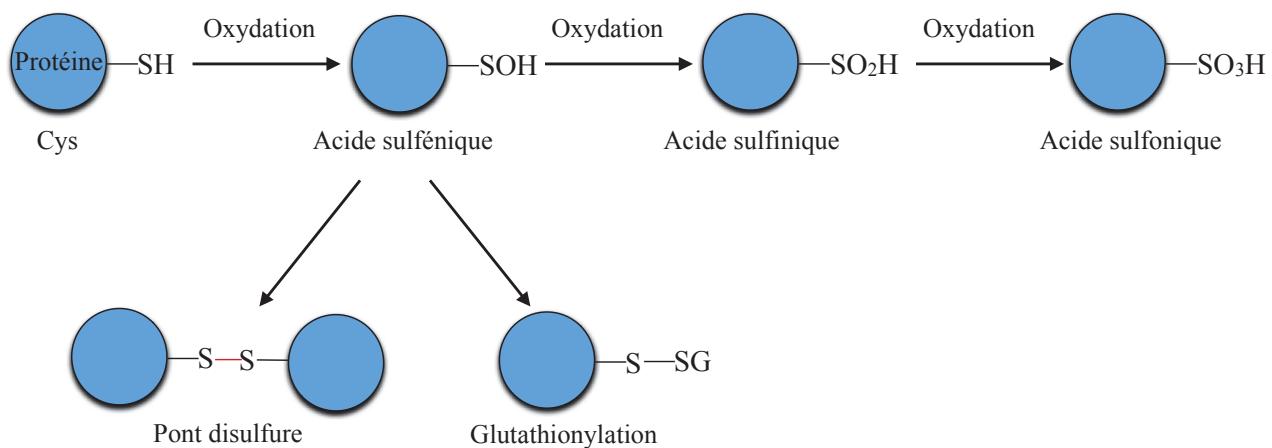
Dans les cas où les ROS sont produits en excès, ou dans un endroit différent dans la cellule, ou quand les enzymes antioxydantes sont produites en quantités non suffisantes, il y aura une augmentation du niveau de molécules oxydantes qui est dangereuse pour la bactérie. Cet effet est appelé stress oxydatif.

#### **1.4.2 - Oxydation des cystéines**

Presque 70 % des molécules endommagées par les ROS sont des protéines; ce qui signifie qu'elles sont la cible la plus importante du stress oxydatif (Corcoran & Cotter, 2013). Les ROS sont très réactifs envers les cystéines à cause de leur groupement thiol (-SH) contenant l'atome de soufre riche en électrons. L'oxydation des sulfures peut entraîner des dommages réversibles ou irréversibles aux protéines qui peuvent mener à leur désactivation.

L'interaction des thiols avec des oxydants induit la formation de l'acide sulfénique (-SOH); davantage d'oxydation amène la formation de l'acide sulfinique (-SO<sub>2</sub>H), puis de l'acide sulfonique (-SO<sub>3</sub>H) (Figure 11). L'acide sulfénique est instable et très réactif; il peut interagir avec des cystéines proches pour former des ponts disulfures. Dans le cas où la protéine contient une seule cystéine, l'acide sulfénique de cette protéine va interagir avec une cystéine d'une autre protéine et former un pont disulfure mixte et non natif, qui entraînera la désactivation des deux protéines et éventuellement leur agrégation (Ezraty, Gennaris, Barras, & Collet, 2017). Cependant, l'oxydation des cystéines en acide sulfénique est une modification réversible grâce à la réduction de la cystéine oxydée. L'acide sulfénique peut aussi être stabilisé par son interaction avec de petites molécules comme le glutathion (Paulsen & Carroll, 2013).

La formation de l'acide sulfinique et sulfonique est une modification irréversible qui peut affecter la fonction de la protéine de plusieurs manières. L'introduction d'un sulfure très réactif peut induire un changement de structure de la protéine. La modification en acide sulfinique et sulfonique peut entraîner la désactivation de l'enzyme, si cette dernière a besoin du thiol comme catalyseur. Les modifications irréversibles des cystéines peuvent déstabiliser le protéome et déclencher des systèmes de réponse au stress au niveau de l'enveloppe (voir section 1.5) (Reddie & Carroll, 2008).



**Figure 11. Oxydation des cystéines.** Un groupement thio (SH) d'une cystéine peut être oxydé dans le périplasme par des dérivés réactifs de l'oxygène en acide sulfénique (-SOH), qui peut être davantage oxydé en acide sulfinique (-SO<sub>2</sub>H) et acide sulfonique (-SO<sub>3</sub>H). L'acide sulfénique peut interagir avec une cystéine, et former un pont disulfure natif ou non natif, ou bien avec le glutathion (GSH), et former une protéine glutathionylée (S-SG). Figure inspirée de Ezraty et al., 2017

#### 1.4.3 - Mécanismes de protection des cystéines de l'oxydation dans le périplasme

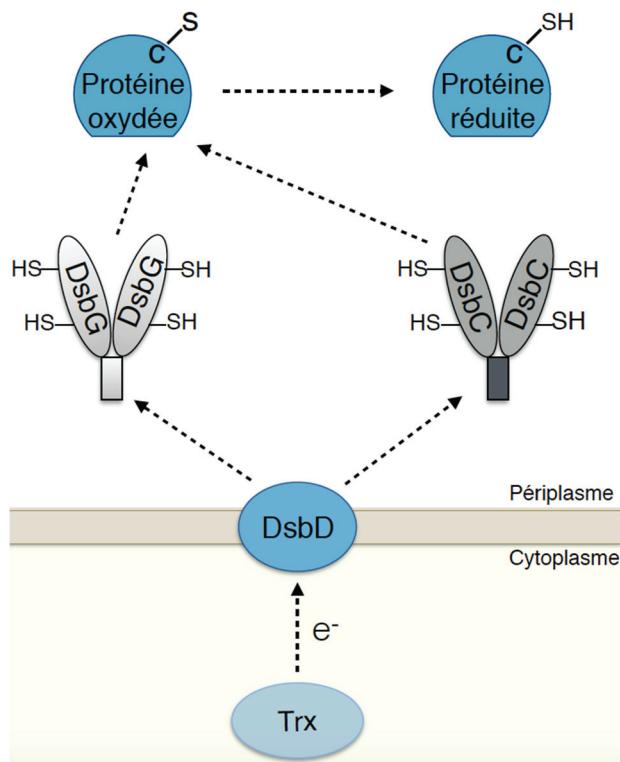
Comme expliqué plus haut, les protéines contenant une cystéine libre dans leur séquence sont des cibles des oxydants présents naturellement dans le périplasme ou produits à des concentrations élevées lors d'un stress oxydatif. Afin de protéger ces cystéines libres, la bactérie utilise des réductases périplasmiques qui maintiennent les cystéines libres sous leur forme réduite, et les protègent des dommages induits par l'oxydation. Chez *E. coli*, les réductases périplasmiques DsbC et DsbG sont impliquées dans le mécanisme de réduction des cystéines libres.

DsbC et DsbG sont des protéines homodimériques présentant un motif CXXC comme site actif (Bessette, Cotto, Gilbert, & Georgiou, 1999; Zapun, Missiakas, Raina, & Creighton, 1995). Les cystéines catalytiques de ce motif sont maintenues sous leur forme réduite par la protéine de la membrane interne DsbD (Figure 12). La protéine DsbD transfère les électrons à partir des thiorédoxines cytoplasmiques vers DsbC et DsbG, oxydées dans le périplasme. La réduction des cystéines catalytiques de DsbC/G est importante pour leur activité réductase (Ezraty et al., 2017). Une fois réduite, DsbC et DsbG vont réduire, à leur tour, les cystéines

contenant un acide sulfénique pour prévenir une modification irréversible de ces cystéines oxydées en acides sulfinique et sulfonique.

Le mécanisme catalytique des réductases DsbC et DsbG est le même. La première cystéine de l'enzyme réduite effectue une attaque nucléophile sur l'acide sulfénique de la cystéine oxydée du substrat. Cela induit la formation d'un pont disulfure mixte non natif entre la réductase et son substrat. La deuxième cystéine réduite de DsbG ou DsbC conduit une autre attaque nucléophile sur le pont disulfure non natif. Cette dernière attaque a pour effet la formation d'un pont disulfure entre les deux cystéines catalytiques de l'enzyme et la libération du substrat avec une cystéine réduite. DsbC et DsbG oxydées vont alors être recyclées par la réductase DsbD (Messens & Collet, 2006).

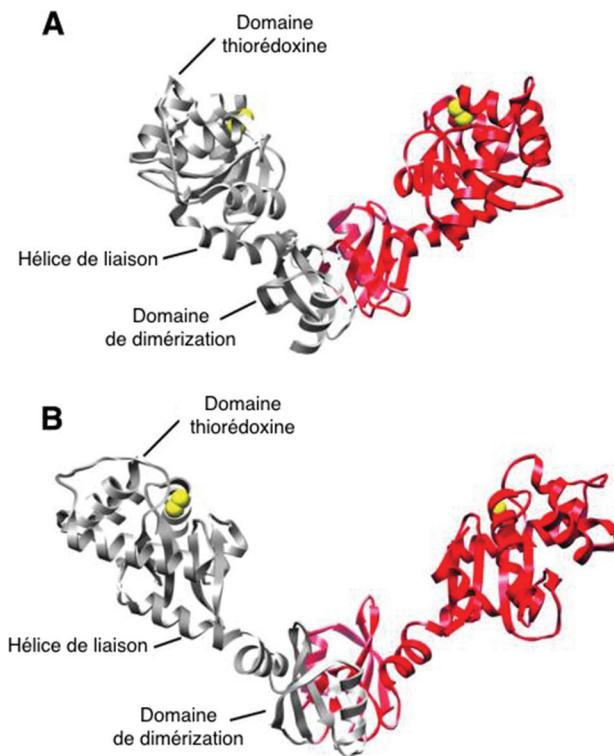
DsbC semble interagir, de préférence, avec des protéines oxydées qui sont partiellement repliées, alors que DsbG les préfère repliées (Denoncin et al., 2014). Les trois L,D-transpeptidases YbiS, ErfK et YnhG ont été identifiées comme les substrats de DsbG. Elles contiennent, comme acide aminé catalytique, une cystéine qui doit être protégée de l'oxydation (Depuydt et al., 2009). Comme décrit dans la section 1.2.6.1, ces enzymes sont responsables de la formation des liaisons DAP-DAP du peptidoglycane et de l'attachement des lipoprotéines de Braun de la membrane externe aux chaînes peptidiques du PG. Récemment, il a été montré que DsbC réduit la cystéine conservée de la protéine périplasmique AraF. Cette protéine est impliquée dans le transport de l'arabinose dans le périplasme (Denoncin et al., 2014).



**Figure 12. Système de réduction des cystéines libres dans le périplasme chez *E. coli*.** Les protéines périplasmiques DsbC et DsbG réduisent les cystéines libres et oxydée dans le périplasme. Ces deux réductases sont maintenues sous leur forme réduite par la protéine de la membrane interne DsbD. DsbD reçoit les électrons des thioréductases (Trx) cytoplasmiques et les transfère vers DsbC et DsbG. Les flèches en pointillé représentent le flux d'électrons. Inspirée de (Arts et al., 2015).

#### 1.4.4- La structure de DsbC et DsbG

DsbC et DsbG présentent 24 % d'homologie de séquence. Les deux sont des protéines homodimériques formant une structure en V (Figure 13). En C-terminal de chaque monomère se trouve le domaine thiorédoxine avec deux cystéines catalytiques (CXXC), et en N-terminal se trouve le domaine de dimérisation. Les deux domaines sont reliés entre eux par une hélice  $\alpha$  (Andersen, Matthey-Dupraz, Missiakas, & Raina, 1997; Bessette et al., 1999). La structure en V forme une fente beaucoup plus large chez DsbG que DsbC. De plus, chez DsbG, cette région est chargée négativement, alors que, chez DsbC, elle est recouverte d'acides aminés non chargés et hydrophobes. Cette particularité suggère que DsbG interagit préférentiellement avec des protéines plus larges et repliées, tandis que DsbC interagit avec de plus petites protéines qui sont sous une forme non ou mal repliées (Heras, Edeling, Schirra, Raina, & Martin, 2004).



**Figure 13. Structure de DsbC (PDB : 1EEJ) (A) et DsbG (PDB : 1V58) (B).** DsbC et DsbG sont des homodimères avec une structure en V; chaque monomère contient un domaine N-terminal de dimérisation et un domaine thioredoxine en C-terminal. Les deux domaines sont reliés par une hélice  $\alpha$ . Les atomes de soufre des cystéines catalytiques sont représentés en jaune. Le dimère de DsbG a été obtenu en utilisant la crystallographie symétrie (Pettersen et al., 2004). Figure tirée de Kadokura & Beckwith, 2010.

#### 1.4.5 - La spécificité de la fonction de DsbC et DsbG

DsbG a été identifiée pour la première fois chez *E. coli* par Andersen *et al.* (Andersen et al., 1997) comme une protéine isomérase impliquée dans la formation des ponts disulfures dans le périplasme. Cependant, DsbG présente une très faible activité isomérase comparativement à DsbC. De plus, la surexpression de DsbG dans un mutant *dsbC* ne supprime que quelques phénotypes défectueux de ce mutant (Berkmen, Boyd, & Beckwith, 2005; Bessette et al., 1999). Toutefois, DsbG semble agir de manière plus efficace comme réductase. Un double mutant *dsbC* et *dsbG* présente une augmentation du niveau d'acide sulfénique dans le périplasme. En revanche, un mutant *dsbG* présente autant d'acide sulfénique que le double mutant *dsbC* et *dsbG*. Cela suggère que DsbG est principalement une réductase qui diminue le niveau d'acide

sulfénique dans le périplasme, alors que DsbC fonctionne comme une réductase secondaire (Depuydt et al., 2009).

*In vitro*, DsbG peut agir comme une chaperonne pour prévenir l'agrégation et promouvoir le repliement des protéines dénaturées (Shao, Bader, Jakob, & Bardwell, 2000). Il a été démontré que la chaperonne DsbG peut interagir avec des protéines totalement ou moyennement repliées ainsi que des protéines non repliées. De plus, l'activité chaperonne de DsbG ne dépend pas de ses cystéines catalytiques, ni de sa forme réduite. Il a été suggéré que la capacité de DsbG à chaperonner le repliement des protéines lui permettrait d'augmenter l'efficacité de son activité réductase.

En plus de son activité isomérase (voir section 1.3.1) et réductase, DsbC présente aussi une activité chaperonne *in vitro*. Cependant, cette activité ne nécessite pas les cystéines de son site actif. Par ailleurs, il a été avancé que DsbC utilise son activité chaperonne pour augmenter l'efficacité de son activité principale (isomérase) en captant les protéines mal repliées (présentant des ponts disulfures non natifs) (Liu & Wang, 2001).

## 1.5 - Les systèmes de réponse au stress dans l'enveloppe

Compte tenu de la complexité de l'enveloppe, et des différentes agressions extérieures auxquelles elle est confrontée, plusieurs systèmes de détection et de réponse au stress dans l'enveloppe sont présents afin de surveiller les défauts et les dommages, et rétablir l'homéostasie. Chez *E. coli*, plusieurs systèmes sont impliqués dans ce processus. Dans cette partie, les différents systèmes de réponse aux dommages dans l'enveloppe, ainsi que le système général de réponse au stress vont être décrits.

### 1.5.1 - Système de réponse à un problème de repliement des protéines de l'enveloppe

L'accumulation de protéines mal repliées (protéines endommagées, non ou pas bien repliées) dans l'enveloppe entraîne la formation d'agrégats qui peuvent mener à la mort de la bactérie, dans le cas où elles ne sont pas dégradées par des protéases ou réparées par des chaperonnes. Il est donc important que la bactérie puisse détecter les dommages au niveau du protéome de l'enveloppe et induire une réponse adaptée afin de rétablir le défaut de repliement. Les deux systèmes de réponse au stress dans l'enveloppe, Cpx et  $\sigma^E$ , sont activés suite à l'accumulation de protéines mal repliées dans l'enveloppe (Raivio, 2014). Les voies de

signalisation du Cpx et de  $\sigma^E$  sont très interconnectées, mais leur mécanisme de transduction du signal diffère (Raivio & Silhavy, 1999).

### 1.5.1.1 - Le système sigma E

Le facteur sigma E ( $\sigma^E$  ou *rpoE*) est produit dans le cytoplasme de *E. coli* de manière constitutive pour répondre à un stress thermique ou un problème de repliement des protéines dans la membrane externe. En absence de stress,  $\sigma^E$  est séquestrée dans la membrane interne par le facteur anti-sigma RseA (Figure 14a). En présence d'un stress,  $\sigma^E$  est libérée dans le cytoplasme à la suite d'une cascade de clivages protéolytiques de RseA. Le facteur  $\sigma^E$  libéré s'associe avec l'ARN polymérase pour diriger la transcription (Miot & Betton, 2004).

La sérine protéase de la membrane interne, DegS, présente un domaine périplasmique important pour sa régulation. Ce domaine se lie à la partie C-terminal des protéines de la membrane externe, lorsqu'elles sont non repliées. Cet attachement induit un changement de l'orientation du site catalytique de DegS permettant le clivage du domaine périplasmique de RseA. Ce premier clivage rend RseA sensible à la protéolyse par RseP, une métalloprotéase avec un site actif à l'intérieur de la membrane interne. RseP clive RseA et libère un fragment soluble de RseA, lié à  $\sigma^E$  dans le cytoplasme. La protéase cytoplasmique ClpXP libère par la suite  $\sigma^E$  (Grabowicz & Silhavy, 2017).

La protéine périplasmique RseB est un autre régulateur du système  $\sigma^E$ . RseB se lie au domaine périplasmique de RseA et le protège du clivage par DegS. Il a été proposé que lorsque DegS s'attache à la partie C-terminal de la protéine non repliée, cette dernière déplace RseB par sa partie N-terminal (Barchinger & Ades, 2013). Une étude suggère que RseB est impliquée dans un autre signal activateur (Lima, Guo, Chaba, Gross, & Sauer, 2013). Elle démontre que RseB s'attache aux LPS lorsque ces derniers sont bloqués dans la membrane interne, ce qui induit le système  $\sigma^E$ . Cet attachement, pourrait déplacer RseB et permettre la protéolyse de RseA par DegS. Le modèle actuel propose que l'activation totale du système  $\sigma^E$  nécessite deux signaux d'induction : l'accumulation de LPS dans la membrane interne; et l'accumulation de protéines de la membrane externe non repliées dans le périplasme (Lima et al., 2013).

Le facteur  $\sigma^E$  se lie à l'ARN polymérase et active la transcription de plusieurs gènes ; parmi eux, des gènes codant pour des facteurs périplasmiques impliqués dans le repliement des

protéines de la membrane externe comme *surA*, *fkpA* et *skp* (voir sections 1.2.3 et 1.3.3). Le système  $\sigma^E$  active aussi l'expression de protéines impliquées dans la synthèse du LPS (Dartigalongue, Missiakas, & Raina, 2001). L'induction des gènes du LPS pourrait s'expliquer par le fait que le LPS agit comme un cofacteur pour le repliement des protéines de la membrane externe (Missiakas et al., 1996). L'activation du système  $\sigma^E$  réduit l'expression de plusieurs gènes codants pour des protéines de la membrane externe comme OmpA, OmpC, OmpX et LamB (Dartigalongue et al., 2001).

Le facteur  $\sigma^E$  ne peut pas inhiber directement l'expression des gènes en se liant à l'ARN polymérase. Cependant, il peut réguler cet effet en induisant des petits ARN comme MicA et RyB qui vont se lier à des ARNs, qui codent pour des protéines de la membrane externe, et inhibiter leur traduction (Coornaert et al., 2010; Johansen, Rasmussen, Overgaard, & Valentin-Hansen, 2006). Les effets transcriptionnels induits par l'activation du système  $\sigma^E$  suggèrent fortement que ce système est impliqué dans la réponse au stress au niveau de la membrane externe.

### 1.5.1.2-Le système Cpx

Le système Cpx comporte deux composants : la protéine de la membrane interne, CpxA, qui perçoit le stress et traduit le signal à travers la membrane interne; et le régulateur transcriptionnel, CpxR (Figure 14b) (Raivio & Silhavy, 1997). La protéine CpxA est composée d'un domaine périplasmique qui perçoit le signal de deux domaines transmembranaires et d'un domaine histidine kinase dans le cytoplasme. L'activation de CpxA se traduit par son autophosphorylation au niveau de son histidine conservée. Par la suite, le phosphate est transféré au résidu aspartate du domaine N-terminal de CpxR. La phosphorylation de CpxR augmente son attachement à l'ADN et active la transcription de gènes impliqués dans la physiologie de l'enveloppe (Raivio & Silhavy, 1997).

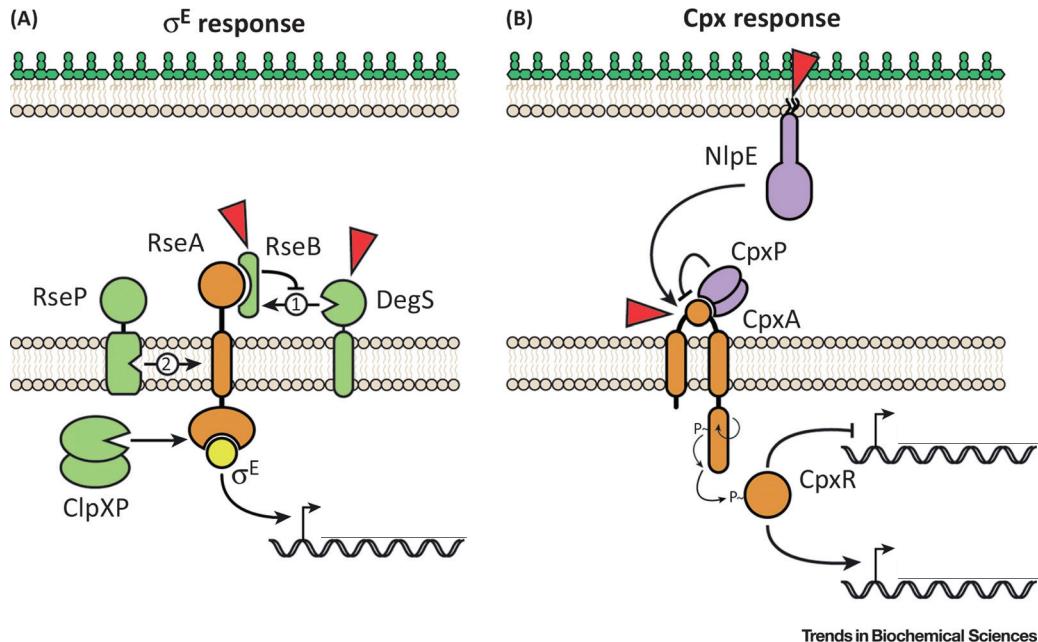
CpxA est régulée par la protéine activatrice, NlpE, et la protéine inhibitrice, CpxP (Figure 14). NlpE est une lipoprotéine de la membrane externe, qui transduit le signal à travers l'enveloppe jusqu'à CpxA. De plus, la surexpression de NlpE induit son accumulation au niveau de la membrane interne, d'où elle peut aussi activer CpxA (Snyder, Davis, Danese, Cosma, & Silhavy, 1995).

CpxP est une protéine périplasmique qui maintient CpxA sous sa forme inactive. Le fait que CpxP soit localisée dans le périplasme suggère qu'elle interagit directement avec CpxA pour la désactiver. En revanche, aucune interaction directe entre CpxA et CpxP n'a été observée jusqu'à présent (Raivio & Silhavy, 2001). Il a donc été suggéré que CpxP s'attache à CpxA par des interactions électrostatiques. Cette hypothèse est basée sur le fait que la surface de CpxP est largement chargée, et que l'utilisation de concentrations élevées de sel déplace CpxP (Zhou et al., 2011).

Plusieurs études suggèrent que le système Cpx est induit à la suite d'altérations au niveau de la membrane interne. Il a été observé que l'absence du phospholipide, phosphatidyléthanolamine (PE), de la membrane interne, active massivement le système Cpx. Ce phospholipide est requis pour le repliement de protéines membranaires, ce qui suppose que l'activation du Cpx, dans ce cas, est une conséquence de la présence de protéines membranaires non structurées (Mileykovskaya & Dowhan, 1997). De plus, il a été montré que l'accumulation de NlpE ou des sous unités du P-pili chez *E. coli*, au niveau de la membrane interne, entraîne l'activation du système Cpx (Jones, Danese, Pinkner, Silhavy, & Hultgren, 1997; Snyder et al., 1995).

L'activation du système Cpx est aussi associée à un problème dans le repliement des protéines périplasmiques (Slamti & Waldor, 2009), à la présence de stress osmotique et à des dommages dans le PG (Delhaye, Collet, & Laloux, 2016; Jones et al., 1997).

L'activation du Cpx se traduit par l'induction de l'expression de gènes codants pour des protéases, chaperonnes et d'autres enzymes du repliement des protéines de l'enveloppe. On retrouve aussi des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et des polysaccharides. D'autre part, le système Cpx diminue l'expression de plusieurs gènes, parmi eux, on retrouve : des gènes impliqués dans le transport membranaire (Raivio, Leblanc, & Price, 2013), comme l'export de la proline ou le lactose (Plate & Suit, 1981), et des gènes de la chaîne de transport d'électrons, comme ceux codant pour la succinate, la NADH déshydrogénase et le cytochrome *bo* oxydase (Raivio et al., 2013). Ces changements transcriptionnels se traduisent par une diminution de la respiration et une altération du gradient de proton (Proton motive force, PMF).



Trends in Biochemical Sciences

**Figure 14. Les systèmes de réponse au stress,  $\sigma^E$  et Cpx, chez *Escherichia coli*.** (A) Le système  $\sigma^E$  est activé par une série de protéolyses qui dégrade le facteur anti-sigma, RseA, et libère  $\sigma^E$  dans le cytoplasme, où il induit l'expression de plusieurs gènes. Le domaine périplasmique de RseA est en premier clivé par DegS. RseB s'attache à RseA et inhibe son clivage par DegS. Il a été proposé que RseB est déplacée loin de RseA suite à son attachement à des LPS bloqués dans la membrane interne ou des protéines non repliées. Le déplacement de RseB permet le clivage de RseA par DegS et le déclenchement de la réponse. RseA est ensuite clivée par la protéase intramembranaire RseP. Juste après, la partie cytoplasmique de RseA est clivée par la protéase ClpXP et le facteur  $\sigma^E$  est libéré. (B) Le système Cpx, à deux composants, détecte le signal par le domaine périplasmique de CpxA. CpxP inhibe l'activation de CpxA, probablement en interagissant avec le domaine senseur de stress de CpxA. NlpE peut sentir le stress et le transmettre au système Cpx. La stimulation de CpxA entraîne son autophosphorylation au niveau de son histidine, et, par la suite, le transfert du phosphate au régulateur CpxR. CpxR va se lier à l'ADN pour réguler la transcription de plusieurs gènes. Les points de perception des stress sont indiqués par les flèches rouges. Figure tirée et modifiée de Grabowicz & Silhavy, 2017.

### 1.5.1.3 –Les similitudes entre le système Cpx et sigma E

Les systèmes Cpx et  $\sigma^E$  semblent tous deux répondre à des altérations au niveau du repliement des protéines dans l'enveloppe. Cependant, l'activation du Cpx semble plutôt être associée à la présence de protéines mal repliées au niveau de la membrane interne, et plus précisément du côté périplasmique de cette dernière, alors que l'activation de  $\sigma^E$  semble être

associée à une altération du repliement des protéines de la membrane externe. Toutefois, dans certains cas, un même signal peut stimuler l'activation des deux systèmes. Par exemple, l'accumulation de sous unités du P-pili au niveau de la membrane interne active les deux systèmes en même temps. Le niveau d'activation du Cpx est, cependant, plus élevée que pour  $\sigma^E$ . De plus, l'accumulation dans la membrane interne de sous unités du ECA (Enterobacterial Commun Antigène) chez *E. coli* entraîne aussi l'activation des deux systèmes (Danese et al., 1998; Jones et al., 1997). Dans ces cas, il est suggéré que l'accumulation des sous unités comme le P-pili ou le ECA entraîne une perturbation au niveau de la membrane interne qui peut affecter le repliement et/ou la translocation de plusieurs classes de protéines de l'enveloppe.

En plus de la présence d'un même signal activateur dans certains cas, les deux systèmes peuvent présenter des similitudes au niveau de leur réponse. En effet, Cpx et  $\sigma^E$  induisent, tous les deux, l'expression de la protéase périplasmique DegP (Danese, Snyder, Cosma, Davis, & Silhavy, 1995; Erickson & Gross, 1989). Cette activation pourrait être due au fait que DegP est impliqué dans la dégradation d'une large variété de protéines mal repliées. De plus, l'activation conjointe du Cpx et de  $\sigma^E$  entraîne une augmentation de l'expression de PPIases, PpiA et PpiD, et FkpA (Danese & Silhavy, 1997). Le fait que les PPIases soient redondantes pourrait suggérer une autre similitude entre la réponse induite par le Cpx et par  $\sigma^E$ .

### 1.5.2 - Le système Rcs

Le système Rcs a été identifié comme étant un régulateur positif de la biosynthèse du composant de la capsule, l'acide colanique, chez *E. coli*. Ce système est un phosphorelais complexe utilisant trois protéines au lieu de deux (comparativement au Cpx). Il est composé : du senseur membranaire, RcsC, qui est une histidine kinase ; de la protéine membranaire intermédiaire, RcsD ; et du régulateur de réponse, RcsB. Le système Rcs utilise également des protéines auxiliaires, RcsA, RcsF et IgaA (Majdalani & Gottesman, 2005).

L'activation du système Rcs engendre une cascade de phosphorylations qui transduisent le signal. Le senseur RcsC perçoit le signal de stress et s'autophosphoryle au niveau de son résidu histidine conservé sur le domaine de phosphorylation. Par la suite, le résidu phosphate est transféré au résidu aspartate de RcsC, sur le domaine de réception. Le phosphate est par la suite transféré sur le résidu histidine de RcsD, avant d'être, une dernière fois, transféré à l'aspartate conservée de RcsB. Le régulateur RcsB phosphorylé peut former un homodimère ou

s’associer avec le cofacteur RscA. Les dimères RcsB-RcsB ou RcsB-RcsA, peuvent directement interagir avec des motifs conservés dans l’ADN et activer l’expression de certains gènes (Cho et al., 2014; Majdalani & Gottesman, 2005).

RcsF est une lipoprotéine de la membrane externe qui active le système Rcs en lui transmettant le signal de stress. Il a été démontré par les laboratoires de Silhavy et de Collet que RcsF interagit avec la protéine de la membrane externe, BamA, et que cette interaction est importante pour le mécanisme de perception du stress par RcsF (Cho et al., 2014; Konovalova, Perlman, Cowles, & Silhavy, 2014). En effet, en absence de stress, RcsF est associée à BamA et ne peut pas activer le système Rcs. En présence de stress, l’attachement entre RcsF et BamA est rompu et RcsF peut interagir avec le répresseur du système Rcs, IgaA, pour activer la cascade de signalisation. Le mécanisme, par lequel l’interaction entre RcsF et IgaA active le système Rcs, et celui par lequel IgaA régule négativement ce système, ne sont pas encore élucidés. Le système de réponse au stress, Rcs, est un mécanisme complexe qui nécessite davantage d’investigations afin de bien comprendre son fonctionnement.

Le système Rcs est induit principalement par des perturbations au niveau de la membrane externe et du peptidoglycane. Chez *E. coli*, l’activation du système Rcs a été observée suite à des dommages au niveau du PG causés par : le lysozyme (Callewaert, Vanoirbeek, Lurquin, Michiels, & Aertsen, 2009); les antibiotiques de type  $\beta$ -lactames (Hinchliffe, Howard, Huang, Clarke, & Wren, 2008); et la modification de la composition du PG en absence des hydrolases PBP4, PBP5, PBP7 et AmpH (Evans, Kannan, Li, de Pedro, & Young, 2013). Concernant les dommages dans la membrane externe, l’activation du système Rcs a été observée lorsque le transport des lipoprotéines est bloqué dans une souche *lolA* mutante (Tao, Narita, & Tokuda, 2012).

Le Rcs perçoit le stress au niveau du PG et induit une réponse qui semble contribuer à la résistance aux antibiotiques de type  $\beta$ -lactames. En effet, il a été démontré que l’activation du Rcs augmente la résistance des bactéries aux  $\beta$ -lactames, alors que sa désactivation augmente la sensibilité des bactéries à ces antibiotiques (Laubacher & Ades, 2008). La réponse Rcs se traduit par la régulation de l’expression de gènes permettant la production d’importantes structures dans la surface de la cellule. Le Rcs induit l’expression des gènes de la production de l’acide colanique, du LPS et des polymères d’exopolysaccharides du biolim, et diminue

l'expression des gènes du flagelle. Parmi les autres gènes induit par le système Rcs se trouvent les gènes *ftsAZ*, importants pour la division cellulaire, et les gènes de l'osmorégulation *bdm* et *osmC* (Mandrup et al., 1998). Rcs est aussi impliqué dans la régulation de l'expression du facteur sigma S (RpoS,  $\sigma^S$ ). En effet, Rcs induit l'expression de *rprA*, codant pour un petit ARN qui stimule la traduction du facteur  $\sigma^S$  (Majdalani, Hernandez, & Gottesman, 2002).

### 1.5.3 - Le système EnvZ/OmpR

Le système à deux composants, EnvZ/OmpR, régule la réponse cellulaire au stress osmotique chez *E. coli* (Stock, Robinson, & Goudreau, 2000). Ce système est composé de la protéine senseur, histidine kinase, EnvZ et du régulateur transcriptionnel OmpR. La protéine EnvZ est au niveau de la membrane interne, et est constituée d'une région cytoplasmique dimérique, avec un domaine contenant une activité kinase et un domaine contenant une activité phosphatase et deux domaines transmembranaires avec une boucle périplasmique. La région membranaire de EnvZ joue un rôle important dans la perception du stress et la transmission du signal à la région cytoplasmique de la protéine (Stock et al., 2000). Une fois activée, EnvZ s'autophosphoryle au niveau de son histidine conservée. Le groupement phosphoryle est, par la suite, transféré au résidu conservé, aspartate, de OmpR. La phosphorylation de OmpR (OmpR-P) induit sa dimérisation puis son attachement à l'ADN, afin de réguler l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la réponse au stress osmotique (Oshima et al., 2002).

OmpR régule l'expression des porines majeures de la membrane externe, OmpC et OmpF, en fonction du niveau d'osmolarité du milieu extérieur. Ces protéines permettent le transport passif de molécules avec une taille inférieure à 650 Da. La protéine OmpF présente un pore plus large que celui de OmpC, ce qui entraîne un passage plus rapide des molécules par OmpF. Dans un milieu à faible osmolarité, l'activité phosphatase de EnvZ est plus importante que son activité kinase, ce qui entraîne une diminution du niveau de OmpR-P et favorise l'expression de OmpF. En revanche, dans un milieu à osmolarité élevé, l'activité kinase de EnvZ est plus importante, entraînant ainsi l'augmentation du niveau de OmpR-P et l'induction de OmpC (Park, Saha, & Inouye, 1998). En plus de OmpC et OmpF, plusieurs autres gènes sont régulés par OmpR. Ces gènes sont impliqués principalement dans: le changement de la composition de la membrane externe (Guillier & Gottesman, 2006); la formation de biofilm

(Prigent-Combaret et al., 2001); l'inhibition de l'expression du flagelle (Shin & Park, 1995); et la résistance aux  $\beta$ -lactames (Hirakawa, Nishino, Yamada, Hirata, & Yamaguchi, 2003).

#### 1.5.4 - Le système Bae

Le système à deux composants, BaeSR, est un autre système de réponse au stress de l'enveloppe. Ce système est activé par l'exposition à un large spectre d'agents, qui endommagent l'enveloppe, tels que l'indole, le tanin, le flavonoïde, et des concentrations élevées de zinc et de cuivre (Leblanc, Oates, & Raivio, 2011; Lee, Barrett, & Poole, 2005). Le BaeSR a aussi été impliqué dans la résistance aux antibiotiques chez *E. coli*, parmi eux, les  $\beta$ -lactames, et ceci en induisant la formation de pompes à efflux (Hirakawa et al., 2003). La protéine membranaire BaeS présente un domaine périplasmique qui perçoit le stress et un domaine cytoplasmique avec une activité histidine kinase. Lors de son activation, BaeS catalyse la phosphorylation du facteur de transcription, BaeR. Ce dernier va se lier à l'ADN pour réguler l'expression de gènes.

L'analyse des changements transcriptionnels chez *E. coli*, à la suite de l'activation du système BaeSR, a révélé une induction de l'expression d'environ 59 gènes. Parmi ces gènes, 8 ont été identifiés comme spécifiques à BaeSR. On retrouve : *mdtABCD* et *arcD*, qui codent pour des systèmes d'export de molécules antibactériennes; les protéines BaeS et BaeR; et la chaperonne périplasmique Spy (Nishino, Honda, & Yamaguchi, 2005). L'expression du gène *spy* est contrôlée par deux régulateurs, BaeR et CpxR. Cependant, il a été proposé que *spy* est induit principalement par BaeR en présence de zinc ou d'un agent dénaturant des protéines, l'éthanol (Srivastava, Lambadi, Ghosh, Pathania, & Navani, 2014). En revanche, *spy* serait induit uniquement par CpxR en présence de cuivre (Yamamoto & Ishihama, 2006; Yamamoto, Ogasawara, & Ishihama, 2008).

#### 1.5.5 - Le système sigma S

Chez *E. coli*, le système de réponse au stress, sigma S (RpoS,  $\sigma^S$ ), est le régulateur principal de la réponse cellulaire à tout type de stress induisant une diminution du taux de croissance, comme une diminution de la quantité de nutriments dans le milieu ou une variation dans le pH, la température et l'osmolarité (Landini, Egli, Wolf, & Lacour, 2014). Même lorsque la croissance est rapide, la présence d'un stress oxydatif peut entraîner l'activation de  $\sigma^S$  (Seaver

& Imlay, 2004). Généralement, la bactérie s'adapte à un stress en induisant une réponse spécifique qui fait directement face aux inducteurs et à leurs effets. Cependant, l'activation du système  $\sigma^S$  entraîne une réponse plus générale. Pour ce faire, ce système est dit : « general stress response ».

Le facteur  $\sigma^S$  se lie à l'ARN polymérase et régule l'expression d'environ 140 gènes. Les gènes induits par  $\sigma^S$  sont impliqués dans des mécanismes de résistance à plusieurs types de stress, par exemple, des gènes du stress osmotique (*otsBA*, *osmB*, *osmE*), ou des gènes impliqués dans le stress oxydatif (*ketE*, *yggE*, *yaiA*, *bsmA*). Lorsque les bactéries se retrouvent dans un milieu pauvre en nutriments, elles diminuent leur vitesse de croissance pour économiser le peu d'énergie disponible. Il a donc été suggéré qu'une réponse généralisée a comme but de se préparer en avance à tout type de stress qui peut survenir (Landini et al., 2014; Peano et al., 2015).

Le facteur  $\sigma^S$  est codé par le gène *rpoS*, et la régulation de son activité se fait à différents niveaux : transcriptionnel, traductionnel, et par la régulation et la dégradation de la protéine. La complexité de sa régulation est due à son rôle majeur de régulateur. En effet, son activation doit être uniquement permise en réponse à un stress environnemental ou physiologique spécifique (Landini et al., 2014).

## 1.6 - Identification de nouveaux facteurs pour la biogenèse de l'enveloppe chez *E. coli*

Durant ces dernières décennies, d'importantes avancées ont été réalisées et ont permis de mieux comprendre les différents mécanismes de l'assemblage et du maintien de l'enveloppe. Cependant, plusieurs processus demeurent encore peu compris, par exemple : comment sont contrôlés les différents mécanismes d'assemblage de l'enveloppe ? Comment ces mécanismes sont-ils coordonnés afin d'assurer une bonne intégrité de l'enveloppe ?

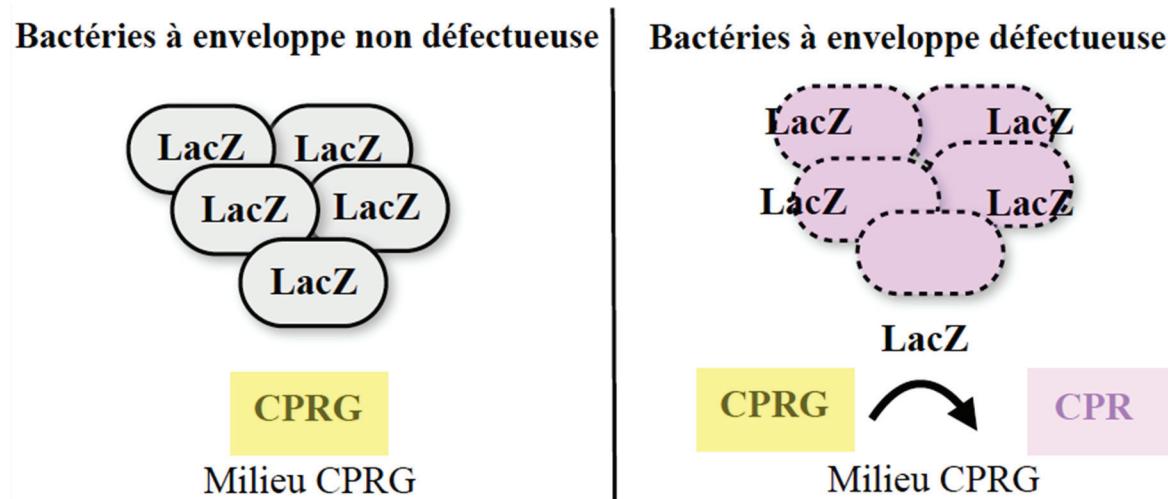
Environ 20 % du génome de *E. coli* code pour des protéines de l'enveloppe et un tiers de ces protéines sont de fonction inconnue (Hu et al., 2009; Stanley, Findlay, Berks, & Palmer, 2001). Ces estimations, combinées au fait que plusieurs mécanismes de l'enveloppe soient encore peu compris, soulignent la nécessité d'identifier de nouveaux facteurs importants à la biogenèse de l'enveloppe chez *E. coli*, et de les caractériser afin d'élargir nos connaissances sur le fonctionnement de ce compartiment cellulaire.

Paradis-Bleau *et al* (Paradis-Bleau, Kritikos, Orlova, Typas, & Bernhardt, 2014) ont adressé ce problème et ils ont développé une stratégie pour cibler le génome de *E. coli* et identifier de nouveaux facteurs impliqués dans la biogenèse de l'enveloppe.

### 1.6.1 - Essai CPRG

Afin d'identifier des mutants bactériens avec une enveloppe défectueuse, le laboratoire du Dr Bernhardt a développé un essai phénotypique basé sur l'utilisation du CPRG (Paradis-Bleau et al., 2014) (Figure 15) : le CPRG (chlorophenyl red- $\beta$ -D-galactopyranoside) est le substrat de la  $\beta$ -galactosidase (LacZ). La molécule de CPRG ne peut pas traverser l'enveloppe bactérienne et être hydrolysée par LacZ. Cependant, chez des mutants défectueux au niveau de leur enveloppe ou présentant un phénomène de lyse, le CPRG peut interagir avec LacZ et être hydrolysé en CPR, qui est un produit de couleur rose (phénomène CPRG $^{+}$ ). Dans ce cas les mutants vont former des colonies roses. Ce test nécessite l'utilisation de l'IPTG pour induire l'opéron lac.

Le test CPRG sur milieu solide est effectué à des températures inférieures ou égales à 30°C, car à des températures plus élevées (ex. 37°C), la couleur rose du CPRG diffuse rapidement et empêche la distinction entre les colonies blanches (enveloppe non défectueuse) et roses (enveloppe défectueuse).



**Figure 15. Principe de l'essai phénotypique CPRG.** Le CPRG, de couleur jaune, est le substrat de la  $\beta$ -galactosidase (LacZ). Le CPRG ne peut pas traverser l'enveloppe bactérienne non défectueuse. Chez les mutants avec une enveloppe défectueuse ou présentant un phénomène de lyse, le CPRG peut rentrer en contact avec LacZ et être hydrolysé en un produit de couleur rose, le CPR. Dans ce cas, les colonies formées par ces mutants vont être de couleur rose.

### **1.6.2 - Criblage de la banque Keio**

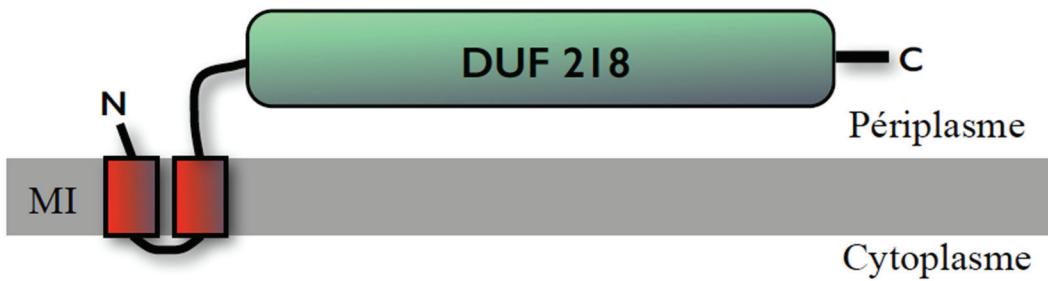
L'essai CPRG a été utilisé pour cibler la banque de mutants Keio. Cette banque est composée de 3985 mutants monogénétiques de *Escherichia coli* K-12 BW25113 (Baba et al., 2006). L'une des particularités de la souche BW25113 est qu'elle soit LacZ<sup>-</sup>. Afin de cibler la Keio avec l'essai CPRG, cette banque a été convertie en Keio LacZ<sup>+</sup> par une technique de conjugaison en masse. Cela consiste à transformer le plasmide pCB112 contenant le gène LacZ sous le contrôle d'un promoteur P<sub>lac</sub>, inducible à l'IPTG, à partir de la souche donneuse vers les souches réceptrices de la banque Keio.

Le criblage a été effectué dans différentes conditions physiologiques afin de maximiser le nombre de facteurs impliqués dans la biogenèse de l'enveloppe identifiées. Le criblage a été effectué à deux concentrations de sel (0 et 1 % de NaCl) et à deux températures différentes, 22 °C et 30 °C. La banque Keio a été ciblée en masse sur des plaques CPRG agar en format de 384 colonies mutantes (Paradis-Bleau et al., 2014). L'analyse des résultats du criblage a été effectuée à l'aide du logiciel Iris (une application permettant de quantifier différentes caractéristiques des colonies, y compris leur couleur) (Kritikos et al., 2017).

Le criblage a permis d'identifier 102 nouveaux facteurs de fonction inconnue, impliqués dans la biogenèse de l'enveloppe. Des facteurs déjà connus comme étant impliqués dans des mécanismes liés à la physiologie de l'enveloppe ont été identifiés (PBP1B, lpoB), ce qui a permis de valider la méthode de criblage.

### **1.6.3 - Le facteur ElyC**

Parmi les mutants identifiés, présentant un phénotype CPRG<sup>+</sup> prononcé, se trouve le mutant inactivé au niveau du gène de fonction inconnue, *yccC*. Ce mutant a présenté un phénotype CPRG<sup>+</sup> prononcé à température pièce (21-22°C) (Paradis-Bleau et al., 2014). Il a été renommé *elyC* pour Elevated Lysis fator C. ElyC et semble être une protéine de la membrane interne ; sa topologie prédite suggère que cette protéine présente deux domaines transmembranaires et un large domaine, le DUF218, de fonction inconnue, dans le périplasme (Figure 16). Le domaine DUF218 est conservé chez les espèces bactériennes (Finn et al., 2008).



**Figure 16. Topologie prédictée de ElyC.** ElyC présente deux domaines transmembranaires, représentés en rouge. Une petite boucle dans le cytoplasme et un large domaine de fonction inconnue, DUF218, représenté en vert, dans le périplasme. MI : membrane interne. Figure tirée de Paradis-Bleau et al., 2014.

Chez *E. coli*, on retrouve quatre protéines avec le domaine DUF218 : ElyC, SanA, YgjQ et YdcF (Finn et al., 2008). Ces protéines sont de fonction inconnue et sont localisées dans la membrane interne avec le domaine DUF218 dans le périplasme, sauf pour YdcF, qui est prédicté comme étant dans le cytoplasme. SanA semble jouer un rôle dans la résistance à la vancomycine à 43°C. Elle est exprimée en phase stationnaire, de manière transitoire, lors d'un choc thermique. Cependant, la fonction de cette protéine n'est pas connue (Rida, Caillet, & Alix, 1996). Quant à la protéine YdcF, son domaine DUF218 présente une structure qui ressemble à celle de la famille des adénines nucléotides hydrolases (Chao et al., 2008). Parmi les quatre protéines contenant un domaine DUF218, seule l'absence de ElyC entraîne un phénotype CPRG<sup>+</sup> à 22°C. De plus, la surexpression de SanA, YgjQ et YdcF, individuellement chez le mutant  $\Delta\text{elyC}$ , ne rétablit pas le phénotype CPRG<sup>+</sup> (Paradis-Bleau et al., 2014), ce qui suggère que ces protéines ne présentent pas la même fonction que le facteur ElyC.

#### 1.6.4 - Phénotypes du mutant $\Delta\text{elyC}$

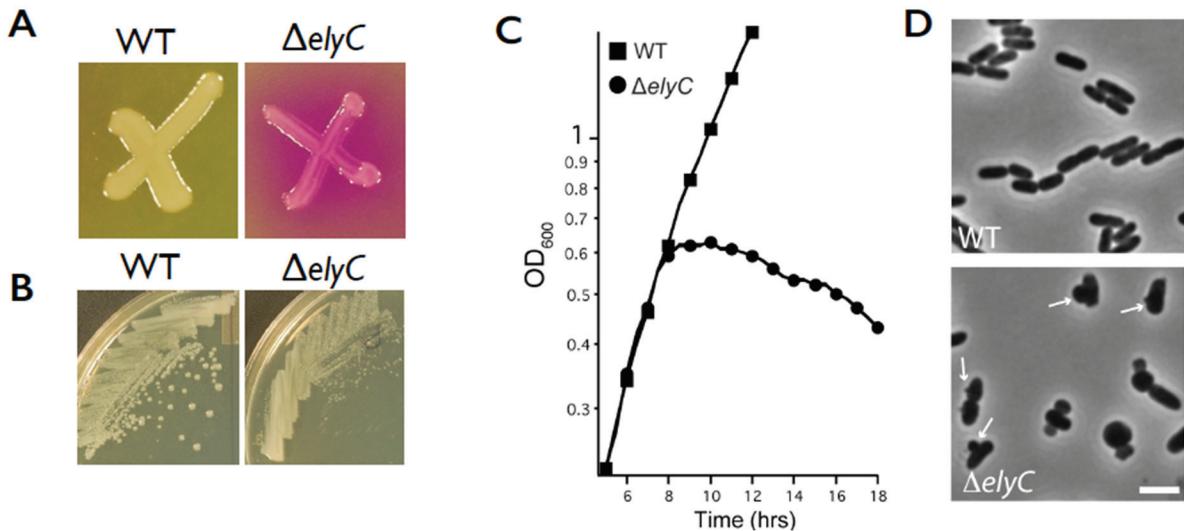
Le phénotype du mutant  $\Delta\text{elyC}$  a été davantage étudié. L'essai CPRG a été réalisé, cette fois, sur deux nouvelles souches : la souche sauvage (WT) MG1655, et son dérivé, le mutant  $\Delta\text{elyC}$ . Par la suite, les deux souches ont aussi été testées sur milieu agar avec 1 % de NaCl. Les deux essais ont été effectués à 22°C. Les résultats avaient montré que, sur milieu CPRG, la souche WT apparaissait blanche alors que la souche  $\Delta\text{elyC}$  apparaissait rose (Figure 17A). Cela a donc confirmé le résultat du criblage de la banque Keio (Paradis-Bleau et al., 2014).

La croissance sur milieu agar avec 1 % de NaCl a montré que le mutant  $\Delta elyC$  forme de petites colonies, comparativement à la souche WT (Figure 17B). Ceci suggère un défaut de croissance en absence du facteur ElyC à température pièce. Cependant, le défaut de croissance devient de moins en moins sévère avec des concentrations de sel moins élevées (Paradis-Bleau et al., 2014).

Comparativement à la souche WT, le mutant  $\Delta elyC$  croît normalement sur LB agar contenant 1 % de NaCl à 30 et 37°C, ce qui suggère que ElyC est plus importante à température pièce, qu'à des températures plus élevées. Ainsi, le phénotype du mutant  $\Delta elyC$  a été davantage étudié à température pièce et qu'à des températures de 30 et 37°C (Paradis-Bleau et al., 2014).

La croissance du mutant  $\Delta elyC$  a été suivie sur milieu LB liquide contenant 1 % de NaCl à 22 °C, et comparée à celle de la souche WT. L'expérience a montré que le mutant  $\Delta elyC$  croît normalement (comparativement au WT) jusqu'au milieu de la phase exponentielle ( $DO_{600\text{nm}}$  de 0.6), puis il commence à décroître brusquement, alors que la souche WT continue à croître (Figure 17C).

L'analyse microscopique des cellules du mutant  $\Delta elyC$ , prélevées juste après le début du déclin de la croissance, montre que les cellules gonflent puis lysent (Figure 17D) (Paradis-Bleau et al., 2014). Le mécanisme de lyse, après gonflement des cellules, est caractéristique des cellules ayant un problème au niveau de leur peptidoglycane. Par exemple, le mécanisme de lyse des cellules exposées à des antibiotiques, de type  $\beta$ -lactames, ressemble exactement au mécanisme de lyse du mutant  $\Delta elyC$  (Donachie & Begg, 1970; Lederberg, 1956). L'analyse microscopique des cellules  $\Delta elyC$ , à différents temps de croissance précédant le début de la lyse, ne montre aucun défaut, comparativement à la souche WT.



**Figure 17. Phénotypes du mutant  $\Delta elyC$  à température pièce.** (A) Le mutant  $\Delta elyC$  a un phénotype  $CPRG^+$  représenté par la couleur rose sur milieu  $CPRG$ , alors que la souche sauvage (WT) reste blanche. (B) Sur milieu agar avec 1 % de  $NaCl$ , le mutant  $\Delta elyC$  forme de petites colonies, ce qui suggère un défaut de croissance. (C) La culture en milieu liquide révèle un déclin de la croissance du mutant  $\Delta elyC$ , après une  $OD_{600\text{nm}}$  d'environ 0.6. (D) L'analyse microscopique des cellules révèle que le mutant  $\Delta elyC$  lyse après gonflement des cellules. Figure tirée de Paradis-Bleau et al., 2014.

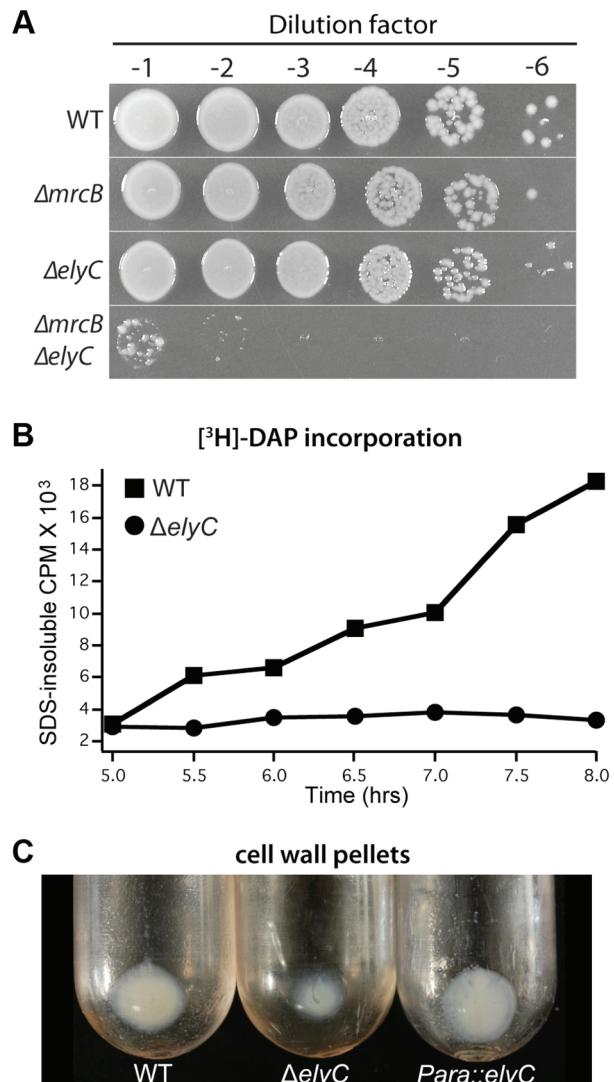
### 1.6.5 - Implication du facteur ElyC dans la biosynthèse du PG à température pièce

Le phénotype de lyse des cellules  $\Delta elyC$  observé par microscopie, suggère la possibilité d'un défaut au niveau du PG. Paradis-Bleau *et al.*, 2014 ont donc testé l'effet d'une double mutation pour le gène *elyC* et le gène codant PBP1A (*mrcA*) ou PBP1B (*mrcB*) (voir section 1.2.6.2). Ces deux PBPs possèdent une activité glycosyl transférase qui permet la formation de la chaîne glycane du PG et une activité transpeptidase pour l'attachement des chaînes glycane entre-elles, par des ponts peptidiques. L'absence d'une de ces PBPs n'induit pas de lyse cellulaire ; par contre, l'absence de ces deux PBPs en même temps est létale (Kato, Suzuki, & Hirota, 1985). Les souches mutantes,  $\Delta elyC \Delta mrcA$  et  $\Delta elyC \Delta mrcB$ , ont été construites et maintenues à 37°C. Cependant, à température pièce, il a été observé que le double mutant  $\Delta elyC \Delta mrcB$  est non viable, alors que le double mutant  $\Delta elyC \Delta mrcA$  présente un défaut de croissance (Figure 18A) (Paradis-Bleau *et al.*, 2014). Ces résultats suggèrent que ElyC est important pour l'assemblage du PG.

Pour vérifier cette hypothèse, un essai de mesure de la biosynthèse du PG a été effectué chez le mutant  $\Delta elyC$  et chez la souche WT. Cet essai mesure la quantité de l'acide aminé, mésodiaminopimélique ( $mA_2pm$  ou mDAP) marqué radioactivement par le tritium [ $^3H$ ], intégré dans le PG. Cet acide aminé est un composant spécifique au PG et constitue également un précurseur pour la synthèse de la lysine. Afin de prévenir l'intégration du mDAP radioactif dans les protéines, la souche utilisée pour cette expérience a été inactivée, au niveau du gène *lysA* requis pour la conversion du mDAP en lysine, et le milieu de culture a été supplémenté de lysine. L'extraction du PG à l'ajout des cellules dans du SDS 4 % bouilli. Dans ces conditions, le PG est le seul composant de la cellule à rester insoluble et peut donc être isolé facilement (Wientjes, Pas, Taschner, & Woldringh, 1985).

L'intégration du mDAP dans le PG a été mesurée à différents temps de croissance. Les données ont montré que la biosynthèse du PG chez le mutant  $\Delta elyC$  est bloquée après environ 5.5 heures de croissance, à température pièce (Figure 18B). Sachant que le temps de génération pour une souche *E. coli* K-12, à température pièce, est d'environ 2 heures, et que la lyse des cellules  $\Delta elyC$  commence après environ 8 heures de croissance, il est possible de dire que la lyse chez le mutant  $\Delta elyC$  se produit après environ une génération cellulaire du début du défaut de PG (Paradis-Bleau et al., 2014). La quantité de PG observée dans les tubes à centrifugation, à la suite de la purification du PG des cellules à  $DO_{600nm}$  de 0.5, est faible chez le mutant  $\Delta elyC$ , comparativement au WT. La complémentation du niveau de PG par l'ajout de ElyC ( $P_{ara}::elyC$ ) indique que ce défaut est lié à l'inactivation du gène *elyC* (Figure 18C).

Ces résultats ont montré que la biosynthèse du PG est bloquée en absence de ElyC, et suggèrent que ce facteur est impliqué dans la biogenèse du PG à température pièce (Paradis-Bleau et al., 2014).



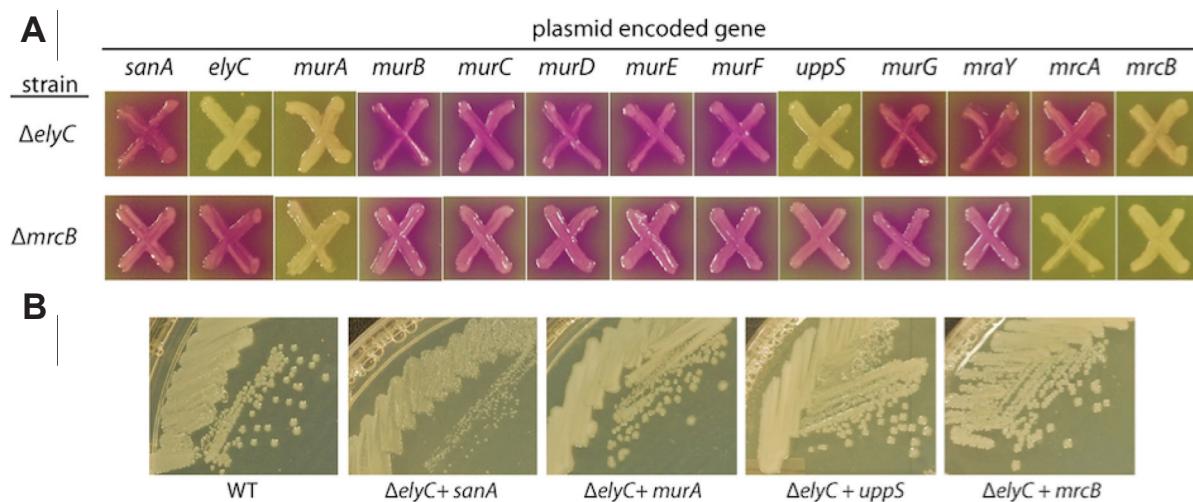
**Figure 18. Le mutant  $\Delta elyC$  présente un défaut de biosynthèse du PG à température pièce.**  
 (A) Test de viabilité des souches : WT,  $\Delta elyC$ ,  $\Delta mrcB$ , et  $\Delta elyC \Delta mrcB$  sur milieu agar avec 1 % de NaCl. (B) La quantification de la biosynthèse du PG chez le WT et le mutant  $\Delta elyC$  par la mesure de l'incorporation du mDAP radioactif dans le PG. (C) Les culots de PG isolés à DO<sub>600nm</sub> de 0.5 à partir des cultures de souches : WT,  $\Delta elyC$ , et  $\Delta elyC$  exprimant ElyC sur un plasmide ( $P_{ara} :: elyC$ ). Figure tirée de Paradis-Bleau et al., 2014.

#### 1.6.6 - Les étapes de biosynthèse du PG affectées par l'absence de ElyC

Afin de déterminer à quelle étape est bloquée la biosynthèse du PG chez le mutant  $\Delta elyC$ , Paradis-Bleau *et al* (Paradis-Bleau et al., 2014) ont procédé par une approche génétique. Cette approche consiste à surexprimer, chez le mutant  $\Delta elyC$ , des facteurs impliqués dans les

différentes étapes de la biosynthèse du PG, et à vérifier par un essai CPRG la suppression du phénotype CPRG<sup>+</sup>.

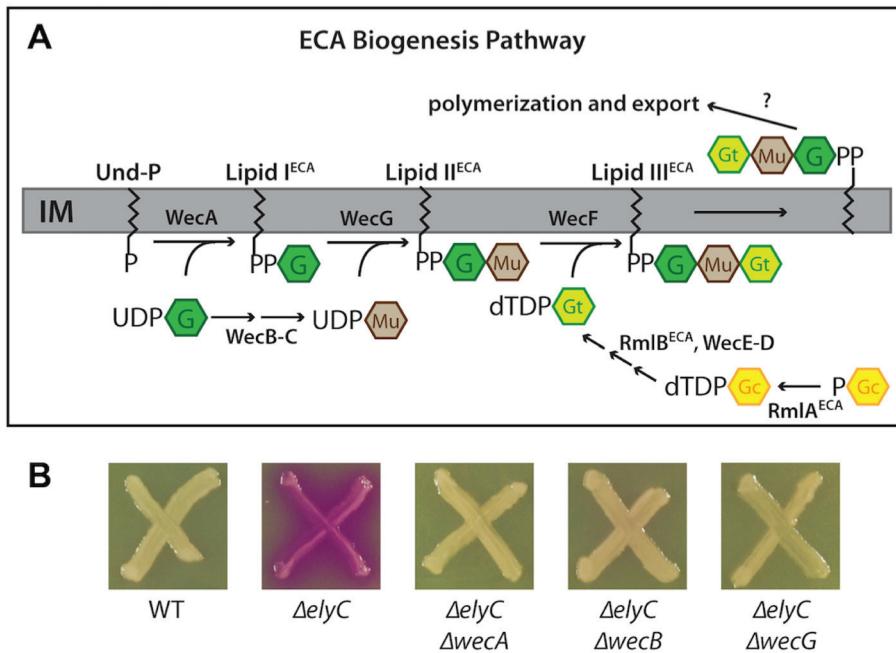
Par cette approche, il a été démontré que la surexpression de MurA, UppS ou PBP1B supprime totalement le phénotype CPRG<sup>+</sup> chez le mutant  $\Delta elyC$  (Figure 19A). Ces facteurs corrigent le défaut de croissance en milieu agar (Figure 19B) et la lyse du mutant en milieu liquide (Paradis-Bleau et al., 2014). Ces enzymes fonctionnent dans les principaux points de transition du mécanisme de biosynthèse du PG (Voir section 1.2.6.1) : MurA est impliquée dans la première étape du mécanisme ; UppS code pour le transporteur lipidique Und-P, qui limite la quantité de précurseurs de PG transférés à la membrane interne ; PBP1B procède à la dernière étape de la polymérisation des unités de lipide II. Pour vérifier la spécificité des suppresseurs, le même test a été réalisé chez un mutant  $\Delta mrcB$ . Ce mutant présente lui aussi un défaut dans le PG et un phénotype CPRG<sup>+</sup> à 22°C. Les résultats obtenus révèlent que UppS est le seul suppresseur spécifique au mutant  $\Delta elyC$ . Cette spécificité a suggéré que le défaut engendré par l'inactivation de ElyC est probablement au niveau du métabolisme du transporteur lipidique, Und-P (Paradis-Bleau et al., 2014).



**Figure 19. Suppresseurs génétiques du mutant  $\Delta elyC$  à température pièce.** (A) Essai CPRG pour les souches mutantes,  $\Delta elyC$  et  $\Delta mrcB$ , contenant des plasmides multi-copies avec des facteurs de la biosynthèse du PG. Les plasmides utilisés proviennent de la banque de plasmides de (Saka et al., 2005). (B) Croissance sur milieu agar avec 1 % de NaCl. La souche WT ne porte pas de plasmide, la souche  $\Delta elyC$  porte des plasmides multi-copies exprimant individuellement SanA, MurA, UppS ou PBP1B. L'expression des gènes sur les plasmides est induite par l'ajout de 100 uM d'IPTG. La protéine SanA est utilisée comme un contrôle négatif de l'effet de suppression. Figure tirée de Paradis-Bleau et al., 2014.

Le transporteur lipidique Und-P chez *E. coli* K-12 est utilisé dans la voie de biosynthèse du PG (Voir section 1.2.6.1) et de ECA (Enterobacterial Common Antigen) (Figure 20A). ECA est un polysaccharide de surface, produit par toutes les bactéries entériques (Danese et al., 1998). Ce polymère est constitué de sous-unités répétitives de GlcNAc, acide acétyl-D-mannosaminuronique (ManNAcA), et de 4-acitamido-4,6-dideoxy-D-galactose (Fuc4NAc). Les étapes de sa biosynthèse sont présentées dans la figure 20A. La voie de biosynthèse de ECA utilise le Und-P pour assembler les unités de sucres, formant ainsi le lipide I puis le lipide II. Paradis-Bleau *et al* (Paradis-Bleau et al., 2014) ont démontré qu'une double inactivation de *elyC* avec *wecA*, *wecG* ou *wecB* supprime totalement le phénotype CPRG<sup>+</sup> (Figure 20B) et rétablit la croissance sur milieu agar et sur milieu liquide. D'autre part, l'inactivation d'*elyC* avec *rmlA* ou *wecF* entraîne un phénotype létal. Ces résultats indiquent qu'un blocage de la synthèse ou de l'utilisation du lipide I de ECA aide à surmonter le défaut entraîné par l'absence de ElyC. Cependant, un défaut dans l'utilisation du lipide II inhibe totalement la croissance en absence de ElyC, ce qui suggère que l'accumulation du lipide II est toxique pour le mutant  $\Delta elyC$  (Paradis-Bleau et al., 2014).

Le fait, que la surproduction de Und-P supprime le phénotype de lyse du mutant  $\Delta elyC$ , et que l'accumulation du lipide II de ECA est toxique en absence de ElyC, suggère que la biosynthèse du PG est hypersensible à la présence de compétition pour le transporteur lipidique Und-P pour la synthèse de ECA (Paradis-Bleau et al., 2014).



**Figure 20. Interaction génétique entre ElyC et la biosynthèse de ECA.** (A) voie de biosynthèse du précurseur de ECA. G : GlcNAc ; Mu : ManNAcA ; Gt : Fuc4NAc ; P-Gc : glucose-1-phosphate. (B) Essai CPRG pour tester les interactions génétiques :  $\Delta\text{elyC}$   $\Delta\text{wecA}$  ;  $\Delta\text{elyC}$   $\Delta\text{wecB}$  ;  $\Delta\text{elyC}$   $\Delta\text{wecG}$ . Les souches WT et  $\Delta\text{elyC}$  sont utilisées comme contrôle. Figure tirée de Paradis-Bleau et al., 2014.

Cette étude a permis l’identification d’un nouveau facteur requis pour la biogenèse de l’enveloppe chez *E. coli*. Il en résulte que ElyC est important pour la biogenèse du PG à température pièce. L’hypothèse finale de cet article est que la biosynthèse du PG chez le mutant  $\Delta\text{elyC}$  serait bloquée, probablement, au niveau de l’étape membranaire du processus.

#### 1.6.7 – Stress oxydatif chez le mutant $\Delta\text{elyC}$

Nous avons observé que le niveau d’oxygène dans le milieu de croissance a un impact sur la croissance du mutant  $\Delta\text{elyC}$  à 21°C. À faible concentration d’oxygène ou dans des conditions de croissance anaérobiques, le mutant  $\Delta\text{elyC}$  ne présente pas de phénotype de lyse. Une étude dans notre laboratoire a montré une surproduction du radical hydroxyle ( $\text{HO}^\bullet$ ) chez le mutant  $\Delta\text{elyC}$  à 21°C. Le  $\text{HO}^\bullet$  est un dérivé réactif de l’oxygène très dangereux pour la bactérie. Il est capable d’induire des dommages irréversibles sur l’ADN, les protéines et les lipides. Dans des conditions physiologiques, le  $\text{HO}^\bullet$  est produit à de faibles concentrations par

la chaîne respiratoire qui utilise l'oxygène. Une augmentation non physiologique du niveau HO<sup>•</sup> ou d'autres ROS entraîne un stress cellulaire, dit stress oxydatif. La diminution du niveau d'oxygène dans le milieu de croissance mène à un ralentissement de la chaîne respiratoire et une diminution du niveau de ROS produit. Cela suggère que le stress oxydatif, induit par l'augmentation du niveau de HO<sup>•</sup> chez le mutant *ΔelyC*, est responsable du phénotype de lyse.

Cette même étude a démontré que l'inhibition de la réaction de Fenton (réaction par laquelle le HO<sup>•</sup> est produit), par l'utilisation d'un chélateur de fer libre, rétablit la biosynthèse du PG et supprime la lyse chez le mutant *ΔelyC*. Cela confirme bien l'implication du stress oxydatif dans le problème de PG chez le mutant.

Dans la littérature, le HO<sup>•</sup> est connu comme ayant pour principale cible l'ADN car il est généralement produit dans le cytoplasme proche de cette molécule, où peut se trouver du fer libéré par les enzymes dites DPS (DNA-protection during starvation). Le HO<sup>•</sup> induit des cassures dans l'ADN ce qui active la réponse SOS pour la réparation des dommages. Parmi les conséquences de l'activation de la réponse SOS, on observe une filamentation de la bactérie due à l'inhibition de la division cellulaire. Or ce phénotype n'a pas été observé chez le mutant *ΔelyC*. De plus, l'analyse de l'expression d'un gène rapportant l'activation de la réponse SOS, *sfIA*, montre que ce gène n'est pas induit dans le mutant *ΔelyC*, ce qui confirme davantage que la réponse SOS n'est pas induite. Ces résultats suggèrent que le HO<sup>•</sup> n'est pas produit dans le cytoplasme mais probablement dans le périplasme. Cette hypothèse a été appuyé par le fait que l'utilisation d'un chélateur de fer qui ne pénètre pas la membrane interne, a permis l'inhibition de la production du HO<sup>•</sup> et la suppression de la lyse chez le mutant *ΔelyC*.

Cette étude de Giacomucci *et al* (donnés pas encore publiés), a démontré la présence d'un stress oxydatif chez le mutant *ΔelyC*. Elle a montré que le stress oxydatif est responsable de l'arrêt de la production de PG et de la lyse du mutant. De plus, cette étude suggère que le stress oxydatif est localisé dans l'enveloppe où il y bloque la biosynthèse du PG. Cependant, le mécanisme par lequel le stress oxydatif pourrait bloquer la production du PG reste à déterminer.

## 1.7 – Problématique et objectifs

L'apparition de mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries pathogènes laissent très peu d'options thérapeutiques pour guérir les infections causées par ces organismes. Les bactéries Gram-négatifs sont les plus résistantes aux antibiotiques comparativement aux Gram-positives et cela, entre autres, en raison du degré d'imperméabilité de leur enveloppe. Afin de remédier au problème de résistance aux antibiotiques, il est important de mieux comprendre le fonctionnement de l'enveloppe bactérienne et d'identifier de nouvelles cibles dans ce compartiment cellulaire. Environ 20 % du génome de *E. coli* code pour des protéines de l'enveloppe et un tiers de ces protéines sont de fonction inconnue (Hu et al., 2009; Stanley et al., 2001). Ainsi il est important d'identifier et d'étudier de nouveaux facteurs impliqués dans la biogenèse de l'enveloppe chez les bactéries Gram-négatifs. Une étude récente a permis d'identifier 102 nouveaux gènes qui codent pour des facteurs importants à l'intégrité de l'enveloppe chez *E. coli* (Paradis-Bleau et al., 2014). Parmi ces facteurs se trouve le facteur ElyC. La fonction de ElyC n'est pas connue, cependant, son inactivation à température pièce (21°C) induit : un stress oxydatif ; un arrêt de la biosynthèse du PG ; et par la suite la lyse du mutant. ElyC est une protéine de la membrane interne avec un large domaine très conservé (DUF218) dans le périplasme. La localisation cellulaire de ce facteur et le phénotype induit par son absence suggèrent que ElyC joue un rôle très important au niveau de l'enveloppe. L'objectif général de mon projet de doctorat est de caractériser le phénotype d'un mutant  $\Delta elyC$  pour mieux comprendre la fonction de ce facteur.

Le premier objectif spécifique de mon projet de doctorat est de déterminer le lien entre le stress oxydatif et l'arrêt de la biosynthèse du PG chez le mutant  $\Delta elyC$  à 21°C. Le stress oxydatif peut causer des dommages à l'ADN, aux lipides et aux protéines. Presque 70 % des molécules endommagées lors du stress oxydatif sont des protéines, ce qui signifie qu'elles sont la cible la plus importante d'un tel stress (Corcoran & Cotter, 2013). Nous avons donc émis l'hypothèse que le stress oxydatif pourrait bloquer la biosynthèse du PG en induisant des dommages oxydatifs sur les protéines, inactivant, ainsi, des facteurs impliqués dans la production de PG.

Le deuxième objectif spécifique de mon projet de doctorat est d'étudier l'importance du facteur ElyC à 37°C. Paradis-Bleau *et al* ont observé que le mutant  $\Delta elyC$  croît normalement

sur milieu agar à 37°C, comparativement à 21°C où il forme de petites colonies (Paradis-Bleau et al., 2014). Cette observation suggère que ElyC est important à 21°C mais pas à 37°C. Afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse, nous avons investigué d'avantage le phénotype du  $\Delta$ *elyC* mutant à 37°C et comparé au phénotype de ce mutant à 21°C.

## Préface au Chapitre 2

Puisque le problème de biosynthèse du peptidoglycane chez un mutant *elyC* semble être lié à un stress oxydatif, nous avons décidé d'identifier le mécanisme par lequel une augmentation du niveau de dérivés réactifs de l'oxygène pourrait affecter la production de PG chez le mutant  $\Delta elyC$ . Nous sommes partis de l'hypothèse que le stress oxydatif pourrait bloquer la biosynthèse du PG en oxydant de manière générale des protéines sensibles aux dommages oxydatifs et que parmi ces protéines, se trouveraient des facteurs importants à la biogenèse du PG. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons procédé par une approche par candidats pour identifier des suppresseurs génétiques du phénotype de lyse du mutant  $\Delta elyC$ . Cette approche nous a permis d'identifier les deux chaperonnes périplasmiques, DsbG et Spy, comme suppresseurs multi-copies de la lyse chez le mutant  $\Delta elyC$ . De plus, nous avons observé une augmentation du niveau d'agrégats protéiques dans l'enveloppe de ce mutant, et nous avons démontré que la surexpression de DsbG et Spy, réduit considérablement le niveau d'agrégation des protéines, corrige le défaut de PG et supprime le phénotype de lyse du mutant  $\Delta elyC$ . Ces résultats appuient nos hypothèses de départ. Cet article a été envoyé aux coauteurs pour révision puis il sera soumis aux pairs dans le but de le publier dans le journal « Molecular Microbiology »

**Article I : Kouidmi, I. Alvarez, L. Collet, J.F. Cava, F. Paradis-Bleau, C. The chaperone activity of DsbG and Spy restore peptidoglycan biosynthesis arrest in the *elyC* mutant by preventing envelope protein aggregation.**

Contribution des auteurs : Le projet a été élaboré par Dr Catherine-Paradis Bleau et moi. Comme premier auteur de cet article ma contribution a été significative. J'ai réalisé plus que la moitié des expériences. J'ai procédé à l'analyse des résultats et à la préparation des figures. J'ai rédigé l'article. Les corrections ont été apportées par mon co-directeur Dr Marc Drolet.

## **CHAPITRE 2 : Article I**

**The chaperone activity of DsbG and Spy restore peptidoglycan biosynthesis arrest in the *elyC* mutant by preventing envelope protein aggregation.**

Imène Koudmi, Laura Alvarez, Jean François Collet, Felipe Cava, and Catherine Paradis-Bleau

RUNNING TITLE: Overproduction of periplasmic chaperones restores peptidoglycan biosynthesis

Keywords: Peptidoglycan; oxidative stress; genetic suppressor, protein aggregation, Chaperone

## Summary

The *Escherichia coli* factor ElyC is important for peptidoglycan (PG) biosynthesis at low temperature. PG production in  $\Delta elyC$  mutant cells is totally blocked after few hours of growth at low temperature and this triggers cell lysis. Recent results showed an increase in hydroxyl radical production that leads to an oxidative stress in these mutant cells. Inhibiting the hydroxyl radical production restored PG biosynthesis and prevented cell lysis. This led us to propose that this oxidative stress could severely damage proteins, including those involved in PG biosynthesis. To test this hypothesis, factors ensuring protein quality control in the cell were overproduced in the  $\Delta elyC$  mutant. We showed that DsbG and Spy overproduction restore PG biosynthesis and suppress  $\Delta elyC$  cells lysis. Furthermore, we found that DsbG acts independently of its reductase activity and known substrates. Rather, DsbG, like Spy, acts as a chaperone to reduce the amount of protein aggregates in the envelope of  $\Delta elyC$  cells. In fact, the amount of protein aggregates was found to be two folds higher in the mutant as compared to the wild-type. Altogether, our results reveal a protein folding defect in the envelope compartment of the  $\Delta elyC$  cells that blocks PG production.

## Introduction

The bacterial cell envelope is a complex and dynamic multi-layered structure. It is the first and major line of defence against threats from external hostile environments. The envelope of Gram-negative bacteria such as *Escherichia coli* (*E. coli*) is composed of the outer (OM) and the inner (IM) membranes with, between them, a thin layer of PG within the periplasmic space (Silhavy *et al.*, 2010, Sutcliffe, 2010). The PG is a unique and essential structural component of the bacterial envelope. It preserves cell integrity by providing mechanical strength against variation in osmotic pressure, it also maintains the cell shape and serves as a platform for the attachment of cell envelope proteins and polysaccharides (Braun & Sieglin, 1970, Neuhaus & Baddiley, 2003, Vollmer *et al.*, 2008). A defect in peptidoglycan biosynthesis pathway causes cell lysis, which makes this pathway one of the best antibacterial target.

The peptidoglycan is composed of linear glycan strands cross-linked by short peptides. The biosynthesis of this macromolecular structure occurs in three principal stages. First, the nucleotide precursors, UDP-*N*- acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) and UDP-*N*- acetylmuramyl pentapeptides (UDP-MurNAc) are synthetized in the cytoplasm. The following stage occurs in the cytoplasmic leaflet of the IM, where the nucleotide precursors are associated with the lipid carrier, undecaprenyl phosphate (Und-P), to form the subunit of the PG (lipid II). Thereafter, the lipid II is flipped across the IM. In the final stage, the lipid II is polymerised into glycan strands and cross-linked to the PG layer (Bouhss *et al.*, 2008, van Heijenoort, 2001). The last stage is more complex than the previous ones and is also much less understood. It is a dynamic and well-controlled process, which involves the spatial and temporal coordination of multiple enzymes complexes such as a coordination between the synthetases that build the PG and attach it to the existent PG, and hydrolases that cut the PG to insert new one.

The ElyC factor was identified recently by Paradis-Bleau *et al.* (Paradis-Bleau *et al.*, 2014) following a genetic screen for bacterial envelope biogenesis mutants in *E. coli*. The phenotypic characterization of the  $\Delta$ elyC mutant cells showed that the cells grow normally at low temperature (21-22°C) until they reach the late-exponential phase when they start to lyse, via a membrane-bulging mechanism. Cell lysis was shown to be a consequence of PG biosynthesis

arrest. Indeed, the direct measurement of PG biosynthesis in the cells by monitoring the incorporation of the radiolabeled PG's precursor, [<sup>3</sup>H]-*meso*-diaminopimelic acid, showed a complete blockage of PG biosynthesis in the  $\Delta$ *elyC* mutant after 5.5 hours of growth at low temperature. Because cells started to lyse after 8 hours of growth, it was suggested that cell lysis is initiated shortly after one mass doubling of the culture, following the expression of the PG defect phenotype (Paradis-Bleau *et al.*, 2014). They also showed that overproduction of the PG biosynthesis enzymes controlling the major transitional point of the process (MurA, UppS and PBP1b), fully suppresses the lysis phenotype of  $\Delta$ *elyC* cells. MurA catalyzes the first step of the nucleotide precursor biosynthesis (Brown *et al.*, 1995), UppS produces the lipid carrier Und-P (Barreteau *et al.*, 2009), which links to the PG precursor and allows its attachment to the inner membrane. PBP1b carries out the final polymerization and cross-link reaction (Vollmer & Bertsche, 2008). MurA and PBP1b overproduction was shown to also suppress the lysis phenotype of PBP1b PG-defective mutant but not UppS. The ability of UppS to correct only the lysis phenotype of  $\Delta$ *elyC* mutant, suggests that this defect is related to PG production in the inner membrane. Supporting this hypothesis, is the observation that blocking the biosynthesis pathway of enterobacterial common antigen (ECA) can suppress the lysis phenotype of the  $\Delta$ *elyC* mutant. Indeed, like PG, ECA production requires the lipid carrier Und-P and thus competes with PG synthesis for the available Und-P pool (Paradis-Bleau *et al.*, 2014).

ElyC is predicted to be an inner membrane protein with two transmembrane domains and a large domain of unknown function (DUF 218) in the periplasm (Finn *et al.*, 2008). The DUF 218 domain is highly conserved in bacteria but little is known about the function(s) of DUF 218 domain-containing proteins (Finn *et al.*, 2008). The presence of several highly conserved charged amino acids may suggest that it possesses an enzymatic activity (Finn *et al.*, 2008, Mulder & Apweiler, 2008). In *E. coli*, four proteins, ElyC, SanA, YgjQ and YdcF, carry a DUF 218 domain. However, the precise function(s) of these proteins is still unknown. SanA was shown to play a role in vancomycin resistance, which may suggest a possible implication of this protein in envelope biogenesis (Mouslim *et al.*, 1998, Rida *et al.*, 1996). Thus, even though not much is known about the DUF 218 domain, the predicted inner membrane/periplasmic localization of the ElyC protein supports the hypothesis that it is involved in PG biogenesis at the level of the envelope.

Recent results in our laboratory showed that the  $\Delta elyC$  mutant displays an elevated level of oxidative stress in comparison to the wild-type strain. Furthermore, the peptidoglycan biosynthesis defect was shown to be corrected by blocking the production of hydroxyl radicals (unpublished results). These observations suggested that the oxidative stress could be responsible for the PG biosynthesis defect in the  $\Delta elyC$  mutant. One hypothesis could be that this oxidative stress inactivated proteins involved in PG biosynthesis. Indeed, oxidative stress can severely damage proteins in such a way that they can lead to their complete inactivation (Arts *et al.*, 2015, Ezraty *et al.*, 2017, Oktiabr'skii *et al.*, 2007). In this study, we wanted to test the hypothesis that the PG biosynthesis defect leading to the lysis of  $\Delta elyC$  cells is related to the accumulation of damaged proteins in the periplasm. We took a candidate approach to identify genetic suppressors of  $\Delta elyC$  phenotypes. We initially overproduced enzymes that protect proteins from oxidative damages and identified the periplasmic reductase DsbG as a multi-copy suppressor of  $\Delta elyC$  cells lysis. Interestingly, we found that the chaperone activity of DsbG, but not its reductase activity, was required to suppress the lysis phenotype. We also identified another periplasmic chaperone, Spy that could also act as a multi-copy suppressor of  $\Delta elyC$  cells lysis. As expected, we found that overproducing DsbG or Spy corrected the PG biosynthesis defect of  $\Delta elyC$  cells. Furthermore, we found that overproducing either DsbG or Spy reduced a high level of proteins aggregation seen in the  $\Delta elyC$  mutant. Altogether, these results suggest that the severe phenotypes of  $\Delta elyC$  cells are related to a protein folding defect in the envelope compartment.

## Results

### The periplasmic reductase DsbG is a multi-copy suppressor of the $\Delta elyC$ mutant lysis phenotype.

To test the hypothesis that reactive oxygen species (ROS) produced during oxidative stress could be responsible for the  $\Delta elyC$  phenotypes, we first overproduced individually each of the Dsb oxidoreductase enzyme (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD, DsbG) that can repair proteins damaged by oxidative stress in the periplasm (Arts *et al.*, 2015). We used plasmids from the Mobile plasmid library that consist in multi-copy plasmids with each of them carrying a different open reading frame (ORF) of the *E. coli* genome (Saka *et al.*, 2005). Plasmids carrying an ORF corresponding to a Dsb protein were transformed individually in the  $\Delta elyC$  mutant cells and expression was induced by adding IPTG. The transformed cells were tested using the CPRG phenotypic assay as described (Paradis-Bleau *et al.*, 2014). CPRG (Chlorophenol red- $\beta$ -D-galactopyranoside) is a  $\beta$ -galactosidase (LacZ) substrate that cannot enter the cells with an intact envelope. Mutants with a permeable envelope or a lysis phenotype produce a bright-pink spot on plates (CPRG<sup>+</sup> phenotype), because of the CPRG cleavage by LacZ. The result of the CPRG phenotypic assay was revealed following overnight incubation at 21°C (Fig. 1A). As expected, the control plasmid carrying ElyC factor suppressed the CPRG<sup>+</sup> phenotype of the  $\Delta elyC$  mutant. Interestingly, among the five different Dsb proteins tested, only DsbG could suppress the CPRG<sup>+</sup> phenotype due to  $\Delta elyC$  cells lysis.

To verify if the suppression of the CPRG<sup>+</sup> phenotype by DsbG overproduction is specific to the  $\Delta elyC$  mutant, we tested the ability of the DsbG overproducing plasmid to correct the CPRG<sup>+</sup> phenotype of the  $\Delta mrcB$  mutant. This mutant lacks the Penicillin-Binding-Protein 1b (PBP1b), an enzyme involved in the polymerization step of the PG biosynthesis (Sauvage *et al.*, 2008). We found that overproducing DsbG did not correct the CPRG<sup>+</sup> phenotype of the  $\Delta mrcB$  mutant. This result suggests that DsbG overproduction specifically corrects the problems leading to  $\Delta elyC$  cells lysis.

As predicted, we found that overproducing DsbG corrected the  $\Delta elyC$  cells lysis phenotype in liquid LB medium at 21°C. In this experiment, DsbG expression was induced by adding 100

uM of IPTG to medium. The  $\Delta elyC$  mutant cells overexpressing DsbG grew as well as the wild-type strain and did not lyse as the mutant does (Fig. 1C). Indeed, as previously reported (Paradis-Bleau *et al.*, 2014),  $\Delta elyC$  mutant cells started to lyse at the late exponential phase ( $OD_{600} \approx 0.6$ ). Altogether, our results show that the periplasmic reductase protein DsbG can act as a specific suppressor of the  $\Delta elyC$  mutant lysis phenotype.

### **DsbG suppresses the lysis phenotype of $\Delta elyC$ mutant cells independently of the L,D-transpeptidase substrates.**

DsbG is a V-shaped dimeric protein with a thioredoxin fold and a CXXC motif (Fig 2A). The cysteines of DsbG are kept reduced by the inner membrane protein DsbD. Reduced DsbG, in turn, reduces the cysteine residue of proteins containing only one cysteine to protect it from ROS oxidation (Fig. 2A). DsbG was shown to reduce the cysteine residue of the L,D-transpeptidase, YbiS and to interact with the two other L,D-transpeptidase, YnhG and ErfK, suggesting that it also reduces their single cysteine (Depuydt *et al.*, 2009, Magnet *et al.*, 2007). Reduced L,D-transpeptidases catalyze reactions of transpeptidation between two peptidoglycan peptide chains to form PG crosslinks, and between PG peptide chains and the outer membrane Braun's lipoprotein (Lpp) (Magnet *et al.*, 2007, Magnet *et al.*, 2008). It is thus possible that DsbG corrects the  $\Delta elyC$  lysis phenotype by protecting the L,D-transpeptidase from oxidative stress damages. To test this possibility, we tested the ability of DsbG to suppress the lysis in  $\Delta elyC$  mutant in the absence of its substrates. The genes coding for the three L,D-transpeptidases were deleted, the mutant was referred as  $\Delta 3$  mutant and no CPRG defective phenotype was observed for this mutant strain (Fig. S1). This result suggest that defects in the activity of these L,D-transpeptidases, e.g. because of their oxidation, are not responsible for the lysis phenotype of the  $\Delta elyC$  mutant. As expected, we found that deleting these genes in the ElyC defective mutant ( $\Delta 4$  mutant) does not suppress the  $CPRG^+$  phenotype (Fig 2B). Importantly, DsbG overproduction in the  $\Delta 4$  mutant was still able to suppress the  $CPRG^+$  phenotype induced by the absence of ElyC. Furthermore, deleting the two additional genes *ycbB* and *ycfS* ( $\Delta 6$  mutant) coding for L,D-transpeptidases that are not known to be substrate for DsbG, did not eliminate the ability of DsbG overproduction to suppress the  $CPRG^+$  phenotype of  $\Delta elyC$  cells. Altogether, these results show that DsbG corrects the lysis phenotype of  $\Delta elyC$  cells independently of its known substrates, L,D-transpeptidases, and suggest that DsbG acts on other proteins.

**DsbG suppresses the lysis phenotype of  $\Delta elyC$  mutant cells independently of its reductase activity.**

Since DsbG does not act on its known substrates to correct the lysis of  $\Delta elyC$  cells, we hypothesized that DsbG might use a novel activity to suppresses the  $\Delta elyC$  mutant lysis phenotype. The group of James Bardwell showed that DsbG has an *in vitro* chaperone activity that is independent of its active site and its reduced state (Shao *et al.*, 2000). As shown in Figure 2A, the reductase activity of DsbG requires the reduction of its two catalytic cysteine residues of the active site (CXXC) by the inner membrane protein DsbD (Bessette *et al.*, 1999, Depuydt *et al.*, 2009). To assess if DsbG requires its reductase activity to suppress the lysis of  $\Delta elyC$  cells we used two different approaches. First, we tested the ability of DsbG overproduction to correct the lysis phenotype of  $\Delta elyC$  cells lacking *dsbD*. We found that DsbG was still able to correct the phenotype in this double mutant. Then, we replaced the catalytic cysteine residues of DsbG by alanine residues (DsbG<sub>(AXXA)</sub>) and we tested the ability of this modified DsbG to suppress the lysis phenotype of the  $\Delta elyC$  mutant. This catalytic mutant of DsbG suppressed the  $\Delta elyC$  lysis phenotype (Fig. 3A, B). As expected, overproducing the catalytic mutant of DsbG (DsbG<sub>(AXXA)</sub>) suppressed the growth defect of the  $\Delta elyC$  mutant in liquid LB medium (Fig. 3C). These results demonstrate that the known reductase activity of DsbG is not required to suppress the  $\Delta elyC$  lysis phenotype.

**Overexpressing the periplasmic chaperone Spy can also correct the  $\Delta elyC$  mutant defects.**

At this stage, we suspected that the described chaperone activity of DsbG might be required to correct the  $\Delta elyC$  phenotypes. The envelope compartment contains a variety of molecular chaperones and folding catalysts that assist protein folding and prevent the aggregation and the degradation of stress damaged-proteins. Because chaperones have a broad range and overlapping substrates, DsbG might not be the only chaperone that could suppress the  $\Delta elyC$  defect. We used a candidate approach to test this hypothesis. We overproduced individually several periplasmic chaperones (Skp, SurA, DegP and Spy) and folding catalysts (FkpA, PpiA and PpiD) (Goemans *et al.*, 2014) in the  $\Delta elyC$  mutant. The suppression effect of each candidate was tested on CPRG plates supplemented with 100  $\mu$ M IPTG. Overproducing the periplasmic chaperone Spy fully corrected the CPRG<sup>+</sup> phenotype of the  $\Delta elyC$  mutant (Fig. 4A). However,

this was not the case for the other chaperones or folding catalysts. Furthermore, the effect of Spy is specific to the  $\Delta elyC$  mutant as its overexpression does not correct the CPRG<sup>+</sup> phenotype of in the  $\Delta mrcB$  mutant (Fig. 4B). As is the case for DsbG, Spy also corrected the growth defect of the  $\Delta elyC$  mutant in liquid LB medium (Fig. 4C). Thus, these results demonstrate that a chaperone activity can correct the phenotypes of the  $\Delta elyC$  mutant and support our hypothesis that the chaperone activity of DsbG acts is required to correct these phenotypes.

**Overexpression of DsbG and Spy restore peptidoglycan biosynthesis in the  $\Delta elyC$  mutant.** Previous studies have shown that  $\Delta elyC$  cells lyse due a defect at the level of peptidoglycan biosynthesis (Paradis-Bleau *et al.*, 2014). We therefore tested the ability of DsbG and Spy overproduction to correct the PG biosynthesis defect. PG was analyzed by using Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC). The analysis was done for three biological replicates of the wild-type, the  $\Delta elyC$  mutant as well as the  $\Delta elyC$  mutant overproducing individually the native DsbG, the catalytic mutant of DsbG, the non-reduced DsbG (DsbG expressed in the absence of its reductase DsbD) or Spy. The cells growing at 21°C were harvested at an OD<sub>600</sub> of 0.5 and the PG was isolated as described (Glauner, 1988). The PG pellets were digested with muramidase and the resulting muropeptides were analyzed by UPLC followed by a statistical analysis of the data. The total PG amount was calculated from the total intensity of the peaks detected in the UPLC analysis. The relative amounts of PG were determined by using the wild-type strain as the reference. As expected, the overproduction of Spy and the DsbG<sub>(AXXA)</sub> restored peptidoglycan biosynthesis in  $\Delta elyC$  mutant by 100% and 89%, respectively (Fig. 5A). The catalytic mutant of DsbG<sub>(AXXA)</sub> was as effective as the native form of DsbG to correct the PG defect (87%), thus indicating that DsbG most likely corrected the PG biosynthesis defect only via its chaperone activity. We also found that Spy was more efficient than DsbG to correct the PG biosynthesis defect of the  $\Delta elyC$  mutant, which suggests that the chaperone activity of Spy was more efficient than that of DsbG in the  $\Delta elyC$  mutant.

We also performed compositional analysis of the PG to verify if the overproduction of DsbG or Spy lead to structural or compositional modifications of the PG in the  $\Delta elyC$  mutant. However, we observed no difference in muropeptides “peaks” composition and abundance in all the samples (Fig. 5B and Table S1, S2). Furthermore, measurement of the cross-linking

percentages, of the average of glycan strand lengths and of the level of PG-OM links revealed no significant differences as compared to PG from wild-type cells (Table S3). Altogether, these results show that overproducing DsbG and Spy chaperones can correct the PG biosynthesis defect of the  $\Delta elyC$  mutant without altering the normal composition or structure of the PG.

### **Overexpression of DsbG causes the $\Delta elyC$ mutant cells to widen.**

In previous study, the microscopic analysis of the  $\Delta elyC$  cells shape revealed that they develop pronounced bulges just before lysis. Bulge formation was linked to the peptidoglycan defect in the absence of ElyC (Paradis-Bleau *et al.*, 2014). Several studies have shown that cell bulging is a typical response to the perturbation of PG biosynthesis (Daly *et al.*, 2011, Nakagawa *et al.*, 1984). As the overproduction of DsbG and Spy restored the peptidoglycan defect, we tested if they could also correct the bulging phenotype. We performed microscopic analysis of the  $\Delta elyC$  mutant overproducing DsbG<sub>(AXXA)</sub> or Spy from cells grown up to an OD<sub>600</sub> of 0.5. At this optical density,  $\Delta elyC$  cells start bulging just before they lyse at an OD<sub>600</sub> of 0.6. As expected, both DsbG<sub>(AXXA)</sub> and Spy overproduction corrected the cell shape defect (no bulging) of the the  $\Delta elyC$  mutant (Fig. 6A). However, we noticed that cells overproducing DsbG<sub>(AXXA)</sub> were slightly wider than wild-type cells. To confirm this observation, we performed cell width measurement of wild-type cells and  $\Delta elyC$  cells carrying DsbG<sub>(AXXA)</sub> or Spy. Three independent experiments were done (100 cells per experiment). The average width of cells overproducing DsbG<sub>(AXXA)</sub>, but not Spy, was found to be significantly higher than that of wild-type cells (Fig 6B). This finding agrees with our observation that Spy was more efficient than DsbG to correct the PG biosynthesis defect of the  $\Delta elyC$  mutant. This suggests that  $\Delta elyC$  cells overproducing DsbG<sub>(AXXA)</sub> are wider because they produce less PG that make them less resistante to internal osmotic pressure.

### **The $\Delta elyC$ mutant has a protein-folding defect which is overcome by overproducing DsbG<sub>(AXXA)</sub> or Spy.**

Molecular chaperones help proteins to fold and prevent the aggregation of misfolded and damaged proteins (Miot & Betton, 2004, Tomoyasu *et al.*, 2001). The fact that overproducing periplasmic chaperones correct the phenotypes of  $\Delta elyC$  cells suggests a problem of protein folding in the periplasm of these cells. It is therefore possible that DsbG or Spy overproduction

act by helping proteins to fold or by preventing the aggregation of damaged proteins due to oxidative stress.

To investigate this possibility, we isolated protein aggregates by using the protocol of Tomoyasu *et al.* (2001), with some changes described in material and method. This protocol allows the isolation of total cellular protein aggregates. Wild-type and  $\Delta$ *elyC* cells as well as  $\Delta$ *elyC* cells overexpressing DsbG<sub>(AXXA)</sub> or Spy were grown at 21°C to an OD<sub>600</sub> of 0.3, the cells were then harvested and the aggregated proteins were isolated. The level of total and aggregated proteins was measured, and a statistical analysis was performed for six different experiments. The level of aggregated proteins was approximatively two folds more elevated in the  $\Delta$ *elyC* mutant than in the wild-type, which corresponds to 10 and 5% of the total proteins level, respectively (Figure 7). Furthermore, overproducing DsbG<sub>(AXXA)</sub> and Spy in  $\Delta$ *elyC* cells reduced the level of aggregated proteins in the mutant, close to the one seen in wild-type cells. DsbG<sub>(AXXA)</sub> was found to be slightly better than Spy. Thus, these results demonstrate the occurrence of excess proteins aggregation in  $\Delta$ *elyC* cells. Since it is corrected by overproducing periplasmic chaperones, the problem is likely at the level of the envelope compartment. Moreover, these results confirm our conclusion that both DsbG and Spy act via their chaperone activity.

## Discussion

The role of the *Escherichia coli* factor, ElyC, in peptidoglycan biosynthesis is not well understood. Recent results in our laboratory highlighted another defect in the  $\Delta elyC$  mutant cells. It was shown that the level of hydroxyl radicals produced by oxidative stress was significantly higher in the  $\Delta elyC$  mutant compared to the wild-type strain. Interestingly, when the production of the radical hydroxyl in the mutant cells was blocked, PG biosynthesis was restored, suggesting that the oxidative stress was somehow responsible for the biosynthesis defect (unpublished results). In this study, we aimed to investigate a possible way by which oxidative stress could affect PG production. Oxidative stress might damage proteins required for the PG biogenesis pathway and inhibit PG synthesis.

Here, we showed that, in the absence of the ElyC factor, the level of protein aggregates in the cell increasead by approximatively two folds. Further, overexpression of the periplasmic chaperones, DsbG and Spy, significantly reduced the amount of protein aggregates, restored PG biosynthesis and suppressed the cell lysis phenotype in  $\Delta elyC$  cells. These results reveal a protein folding defect in the envelope compartment of the  $\Delta elyC$  mutant that might be responsible for the PG biosynthesis defect and cell lysis.

The periplasmic protein DsbG is also known as a reductase that protect single-cysteine containing proteins from oxidation (Depuydt *et al.*, 2009). However, in this study, we showed that DsbG does not act through this activity to suppress  $\Delta elyC$  cell lysis. In fact, the two catalytic cysteines of DsbG as well as their reduced form, were not essential to alleviate the major phenotypes of the  $\Delta elyC$  mutant. Rather, our study strongly suggests that the chaperone activity of DsbG is most likely involved in the suppression of the  $\Delta elyC$  phenotypes. Shao *et al.*, 2000 have shown that DsbG has a general chaperone activity *in vitro*, which does not require the two catalytic cysteines and the reduced form of DsbG. Other results in this study further support the fact that DsbG acts as chaperone. Firstly, Spy, a periplasmic chaperone, can act as a multi-copy suppressor of  $\Delta elyC$  cell lysis. This demonstrates that the  $\Delta elyC$  cell lysis defect can be overcome by overexpressing a periplasmic chaperone. Secondly an important level of

aggregated proteins was found in the ElyC defective cells. Furthermore, this defect could be alleviated by the assistance of molecular chaperones.

Spy was recently identified as a periplasmic chaperone (Quan *et al.*, 2011). The *spy* gene is massively and rapidly induced following cells exposure to protein unfolding agents, such as butanol, ethanol, and tannic acid (Neidhardt *et al.*, 1984, Quan *et al.*, 2011, Rutherford *et al.*, 2010). Furthermore, Spy overproduction was shown to be necessary and sufficient to enhance the folding level of the unstable protein Im7 in the periplasm of *E. coli* (Quan *et al.*, 2011). Spy expression is under the control of the Bae and Cpx envelope stress response systems (Srivastava *et al.*, 2014). These two systems are known to respond to stress conditions that induce protein folding defect in the envelope compartment (Duguay & Silhavy, 2004, Raivio, 2014, Raivio & Silhavy, 2001). For all these reasons, Spy is suggested to be an important periplasmic chaperone that protect proteins by preventing their aggregation/proteolysis, and by facilitating their folding (Horowitz *et al.*, 2017, Quan *et al.*, 2011). The identification of Spy as a multi-copy suppressor of the  $\Delta$ *elyC* cell lysis supports the presence of protein folding defects in the envelope compartment. Here, the overproduction of DsbG and Spy periplasmic chaperones was shown to significantly reduce the level of protein aggregates in the  $\Delta$ *elyC* mutant. This demonstrates that the proteins folding defect in the  $\Delta$ *elyC* mutant is in the envelope and not in the cytoplasm.

Thus, the overproduction of both DsbG and Spy likely restored PG biosynthesis by suppressing the protein folding defect. However, the substrate(s) on which the chaperones acted to correct the phenotypes of  $\Delta$ *elyC* cells remain(s) to be identified. It is tempting to speculate that the protein folding defect in the mutant  $\Delta$ *elyC* affects a wide range of envelope proteins that requires a high level of chaperones in the periplasm.

Starting from the hypothesis that an oxidative stress might damage proteins and alter their activities, resulting in PG biosynthesis arrest and  $\Delta$ *elyC* cell lysis, we demonstrated that, in fact, the  $\Delta$ *elyC* mutant produce an important protein folding defect in the envelope compartment. Interestingly, it was suggested that the oxidative stress in the  $\Delta$ *elyC* mutant is also located in the envelope (unpublished data). Altogether, these results lead us to propose the speculative model about how the PG biosynthesis process might be affected in the  $\Delta$ *elyC* cells and how the

overproduction of DsbG and Spy may restore the PG production and suppress the cell lysis (Figure 8). This model proposes that oxidative stress causes envelope protein damages, leading to their inactivation and the formation of aggregates. Among the damaged proteins, there may be enzymes important for PG biosynthesis pathway and/or their cofactors in the envelope. Thus, the PG production is blocked and finally the  $\Delta elyC$  cells lyse. The high level of DsbG and Spy chaperones in the periplasm protects unstable proteins by binding to their surface, which avoid aggregation and promote refolding.

## **Experimental Procedures**

### **Media**

Cells were grown in Luria-Bertani (LB) [1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl], plates contained 1.5% agar. Antibiotics were used at 50, 20, 10 µg/ml for ampicillin, kanamycin and chloramphenicol, respectively. CPRG was used at 20 µg/ml and IPTG at 100 µM.

### **Strains and plasmids**

Strains, plasmids and primers are listed in Table S4, S5 and S6, respectively. All *E. coli* strains used in this study are derivatives of MG1655. Gene deletions in the strains listed in Tables S3 were introduced by P1 transduction. The kanamycin resistance cassette was eliminated using FLP recombinase produced from pCP20 (Cherepanov & Wackernagel, 1995). All strains were confirmed by PCR.

Plasmids from the multicopy ORF library (Saka *et al.*, 2005) consist of ColE1-driven vector that encode untagged proteins expressed under control of the *tac* promoter. The plasmid from the multicopy ORF library that carry *dsbG* was used to mutate the two cysteines residues of the active site of DsbG by using Q5 Hot Start High Fidelity DNA Polymerase product (New England BioLabs) and the primers pair DsbG(AXXA)\_FW/ DsbG(AXXA)\_RV resulting in plasmid named pIK4 (Table S6).

### **Suppression analysis of CPRG phenotype**

To assess the CPRG phenotypes of various strains, cells were streaked on LB agar plates and grown overnight at 37°C. For cells with multicopy plasmids the LB agar plates were supplemented with ampicillin. Single colonies from the freshly streaked LB agar plated were patched on CPRG plates containing IPTG. The CPRG plates were incubated for 14-16 hours at 21°C and then photographed.

### **Assessment of growth in liquid media**

To monitor the growth of the various cell cultures in liquid medium, overnight cultures of each cells was grown at 37°C in LB medium, cultures with multicopy plasmid were supplemented with ampicillin. These cultures were diluted to an OD<sub>600</sub> = 0.02 in fresh LB medium and IPTG

was added in cultures carrying multicopy plasmid to induce gene expression. The diluted cultures were then incubated at 21°C with an agitation of 250 rpm. Measurement of the cultures OD<sub>600</sub> were then taken every 2 hours.

### **Peptidoglycan quantification and compositional analysis by UPLC**

Overnight cultures of the corresponding strains were diluted to an OD<sub>600</sub> of 0.02 in 500 ml of LB medium and the cell cultures with multicopy plasmid were supplemented with 100 µM IPTG for gene expression. The cultures were grown at 21°C to an OD<sub>600</sub> = 0.5 and the PG was isolated using the boiling SDS method (Glauner, 1988). The isolated PG samples were then treated with pronase E at 100 µg/ml to remove Braun's lipoprotein. After addition of SDS 1% (w/v) final concentration, reactions were heat-inactivated and detergent was removed by additional washing steps. The washed samples were digested with muramidase 100 ug/ml for 16 hours at 37°C and then the reaction was stopped by boiling. The coagulated proteins were removed by centrifugation at 14000 rpm for 10 min. The supernatants were reduced after 30 min incubation at low temperature with 150 µl of 0.5 M of sodium borate pH 9.5 and sodium borohydride 10 mg/ml. The samples pH was finally adjusted to 3.5 with phosphoric acid.

UPLC analyses of muropeptides were performed on a Waters UPLC system (Waters Corporation, USA) equipped with an ACQUITY UPLC BEH C18 Column, 130Å, 1.7 µm, 2.1 mm X 150 mm (Waters, USA) and a dual wavelength absorbance detector. Elution of muropeptides was detected at 204 nm. Muropeptides were separated at 37°C using a linear gradient from buffer A (phosphate buffer 50 mM, pH 4.35) to buffer B (phosphate buffer 50 mM, pH 4.95, methanol 15% (v/v) in a 20 minutes run, with a 0.25 ml/min flow.

### **Imaging and analysis of cell shape**

Cells were grown overnight in LB medium at 37°C. The cultures were then diluted to an OD<sub>600</sub> = 0.02 in fresh LB medium and IPTG was added in cell cultures carrying multicopy plasmid. These cultures were grown at 21°C and cells were imaged when they reached OD<sub>600</sub> of 0.5. 3 µl of cells were placed onto 0.8% agar pads and visualized by phase-contrast with a Nikon Eclipse E600 microscope using a 100X oil immersion objective and a DS-Ri2 Nikon camera. Image analysis and cell width measurement were processed using Image J.

### **Isolation of aggregated proteins**

The isolation of aggregated proteins was done as described by Tomoyasu *et al.*, 2001 with the following modification. Bacterial cultures were grown in 25 ml of LB media at 21°C, bacterial cultures carrying multi-copy plasmid was supplemented with 100 µM of IPTG. At OD<sub>600</sub> of 0.3 the cells were harvested by centrifugation. The pellets were resuspended in 40 µl of buffer A (10 mM of potassium phosphate buffer, pH 6.5, 1mM EDTA, 20% (w/v) sucrose, 1mg/ ml of lysozyme and 1.4 mM of PMSF) followed by 30 min incubation on ice. Cells were then supplemented with 360 µl of buffer B (10 mM of potassium phosphate buffer, pH 6.5, 1mM EDTA and 1.4 mM of PMSF), mixed, following by sonication on ice. Intact cells were removed by centrifugation at 2000 g for 15 min at 4°C. The insoluble fraction containing membrane and aggregated proteins was isolated by centrifugation at 15 000 g for 20 min at 4°C. The pellet fractions were frozen, then resuspended in 1 ml of buffer B by brief sonication and then centrifugated at 15 000 g for 20 min at 4°C. This washing procedure was repeated. Afterwards, 200 µl of 10% (w/v) of NP-40 was added and the mixture was incubated four hours at 4°C with agitation. The aggregated proteins were isolated by centrifugation at 15 000 g for 30 min at 4°C. The soluble fractions containing membrane proteins were conserved and the insoluble pellets (containing aggregates) were resuspended in 200 µl of buffer B. The protein quantification was performed using the Bradford method (Bradford, 1976).

### **Statistical analysis**

The program GraphPad PRISM® Software (Inc., San Diego CA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) version 6.0 has been used for all statistical analyses. To determine the significance of the data, the t-test (unpaired) has been performed for three independent replicates.

## References

- Arts, I.S., A. Gennaris & J.F. Collet, (2015) Reducing systems protecting the bacterial cell envelope from oxidative damage. *FEBS letters* **589**: 1559-1568.
- Barreteau, H., S. Magnet, M. El Ghachi, T. Touze, M. Arthur, D. Mengin-Lecreux & D. Blanot, (2009) Quantitative high-performance liquid chromatography analysis of the pool levels of undecaprenyl phosphate and its derivatives in bacterial membranes. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **877**: 213-220.
- Bessette, P.H., J.J. Cotto, H.F. Gilbert & G. Georgiou, (1999) In vivo and in vitro function of the *Escherichia coli* periplasmic cysteine oxidoreductase DsbG. *The Journal of biological chemistry* **274**: 7784-7792.
- Bouhss, A., A.E. Trunkfield, T.D. Bugg & D. Mengin-Lecreux, (2008) The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS microbiology reviews* **32**: 208-233.
- Bradford, M.M., (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Braun, V. & U. Sieglin, (1970) The covalent murein-lipoprotein structure of the *Escherichia coli* cell wall. The attachment site of the lipoprotein on the murein. *Eur J Biochem* **13**: 336-346.
- Brown, E.D., E.I. Vivas, C.T. Walsh & R. Kolter, (1995) MurA (MurZ), the enzyme that catalyzes the first committed step in peptidoglycan biosynthesis, is essential in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **177**: 4194-4197.
- Cherepanov, P.P. & W. Wackernagel, (1995) Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**: 9-14.
- Daly, K.E., K.C. Huang, N.S. Wingreen & R. Mukhopadhyay, (2011) Mechanics of membrane bulging during cell-wall disruption in gram-negative bacteria. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* **83**: 041922.
- Depuydt, M., S.E. Leonard, D. Vertommen, K. Denoncin, P. Morsomme, K. Wahni, J. Messens, K.S. Carroll & J.F. Collet, (2009) A periplasmic reducing system protects single cysteine residues from oxidation. *Science* **326**: 1109-1111.

- Duguay, A.R. & T.J. Silhavy, (2004) Quality control in the bacterial periplasm. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 121-134.
- Ezraty, B., A. Gennaris, F. Barras & J.F. Collet, (2017) Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **15**: 385-396.
- Finn, R.D., J. Tate, J. Mistry, P.C. Coggill, S.J. Sammut, H.R. Hotz, G. Ceric, K. Forslund, S.R. Eddy, E.L. Sonnhammer & A. Bateman, (2008) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **36**: D281-288.
- Glauner, B., (1988) Separation and quantification of muropeptides with high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* **172**: 451-464.
- Goemans, C., K. Denoncin & J.F. Collet, (2014) Folding mechanisms of periplasmic proteins. *Biochim Biophys Acta* **1843**: 1517-1528.
- Horowitz, S., P. Koldewey, F. Stull & J.C. Bardwell, (2017) Folding while bound to chaperones. *Curr Opin Struct Biol* **48**: 1-5.
- Magnet, S., S. Bellais, L. Dubost, M. Fourgeaud, J.L. Mainardi, S. Petit-Frere, A. Marie, D. Mengin-Lecreux, M. Arthur & L. Gutmann, (2007) Identification of the L,D-transpeptidases responsible for attachment of the Braun lipoprotein to *Escherichia coli* peptidoglycan. *Journal of bacteriology* **189**: 3927-3931.
- Magnet, S., L. Dubost, A. Marie, M. Arthur & L. Gutmann, (2008) Identification of the L,D-transpeptidases for peptidoglycan cross-linking in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **190**: 4782-4785.
- Miot, M. & J.M. Betton, (2004) Protein quality control in the bacterial periplasm. *Microb Cell Fact* **3**: 4.
- Mouslim, C., D.A. Cano & J. Casadesus, (1998) The sfiX, rfe and metN genes of *Salmonella typhimurium* and their involvement in the His(c) pleiotropic response. *Mol Gen Genet* **259**: 46-53.
- Mulder, N.J. & R. Apweiler, (2008) The InterPro database and tools for protein domain analysis. *Curr Protoc Bioinformatics Chapter 2*: Unit 2 7.
- Nakagawa, J., S. Tamaki, S. Tomioka & M. Matsuhashi, (1984) Functional biosynthesis of cell wall peptidoglycan by polymorphic bifunctional polypeptides. Penicillin-binding protein 1Bs of *Escherichia coli* with activities of transglycosylase and transpeptidase. *The Journal of biological chemistry* **259**: 13937-13946.

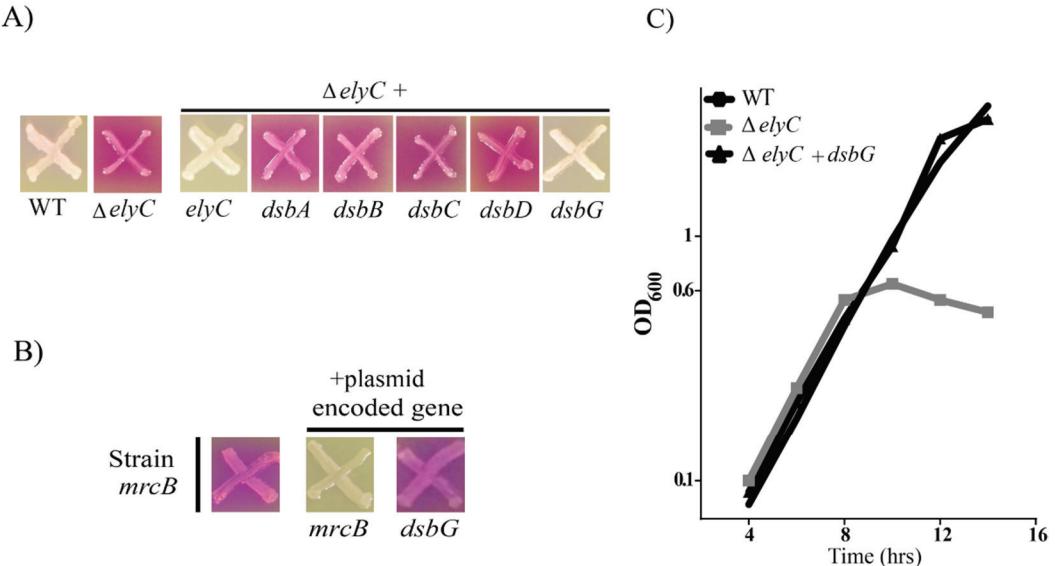
- Neidhardt, F.C., R.A. VanBogelen & V. Vaughn, (1984) The genetics and regulation of heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* **18**: 295-329.
- Neuhaus, F.C. & J. Baddiley, (2003) A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 686-723.
- Oktiabr'skii, O.N., N.G. Muzyka, V. Ushakov & G.V. Smirnova, (2007) [The role of thiol redox systems in the peroxide stress response of *Escherichia coli*]. *Mikrobiologiya* **76**: 759-765.
- Paradis-Bleau, C., G. Kritikos, K. Orlova, A. Typas & T.G. Bernhardt, (2014) A genome-wide screen for bacterial envelope biogenesis mutants identifies a novel factor involved in cell wall precursor metabolism. *PLoS genetics* **10**: e1004056.
- Quan, S., P. Koldewey, T. Tapley, N. Kirsch, K.M. Ruane, J. Pfizenmaier, R. Shi, S. Hofmann, L. Foit, G. Ren, U. Jakob, Z. Xu, M. Cygler & J.C. Bardwell, (2011) Genetic selection designed to stabilize proteins uncovers a chaperone called Spy. *Nat Struct Mol Biol* **18**: 262-269.
- Raivio, T.L., (2014) Everything old is new again: an update on current research on the Cpx envelope stress response. *Biochim Biophys Acta* **1843**: 1529-1541.
- Raivio, T.L. & T.J. Silhavy, (2001) Periplasmic stress and ECF sigma factors. *Annu Rev Microbiol* **55**: 591-624.
- Rida, S., J. Caillet & J.H. Alix, (1996) Amplification of a novel gene, sanA, abolishes a vancomycin-sensitive defect in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **178**: 94-102.
- Rutherford, B.J., R.H. Dahl, R.E. Price, H.L. Szmidt, P.I. Benke, A. Mukhopadhyay & J.D. Keasling, (2010) Functional genomic study of exogenous n-butanol stress in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **76**: 1935-1945.
- Saka, K., M. Tadenuma, S. Nakade, N. Tanaka, H. Sugawara, K. Nishikawa, N. Ichiyoshi, M. Kitagawa, H. Mori, N. Ogasawara & A. Nishimura, (2005) A complete set of *Escherichia coli* open reading frames in mobile plasmids facilitating genetic studies. *DNA Res* **12**: 63-68.
- Sauvage, E., F. Kerff, M. Terrak, J.A. Ayala & P. Charlier, (2008) The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS microbiology reviews* **32**: 234-258.
- Shao, F., M.W. Bader, U. Jakob & J.C. Bardwell, (2000) DsbG, a protein disulfide isomerase with chaperone activity. *The Journal of biological chemistry* **275**: 13349-13352.
- Silhavy, T.J., D. Kahne & S. Walker, (2010) The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**: a000414.

- Simons, R.W., F. Houman & N. Kleckner, (1987) Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* **53**: 85-96.
- Srivastava, S.K., P.R. Lambadi, T. Ghosh, R. Pathania & N.K. Navani, (2014) Genetic regulation of spy gene expression in *Escherichia coli* in the presence of protein unfolding agent ethanol. *Gene* **548**: 142-148.
- Sutcliffe, I.C., (2010) A phylum level perspective on bacterial cell envelope architecture. *Trends Microbiol* **18**: 464-470.
- Tomoyasu, T., A. Mogk, H. Langen, P. Goloubinoff & B. Bukau, (2001) Genetic dissection of the roles of chaperones and proteases in protein folding and degradation in the *Escherichia coli* cytosol. *Molecular microbiology* **40**: 397-413.
- van Heijenoort, J., (2001) Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan monomer unit. *Nat Prod Rep* **18**: 503-519.
- Vollmer, W. & U. Bertsche, (2008) Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **1778**: 1714-1734.
- Vollmer, W., D. Blanot & M.A. de Pedro, (2008) Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS microbiology reviews* **32**: 149-167.

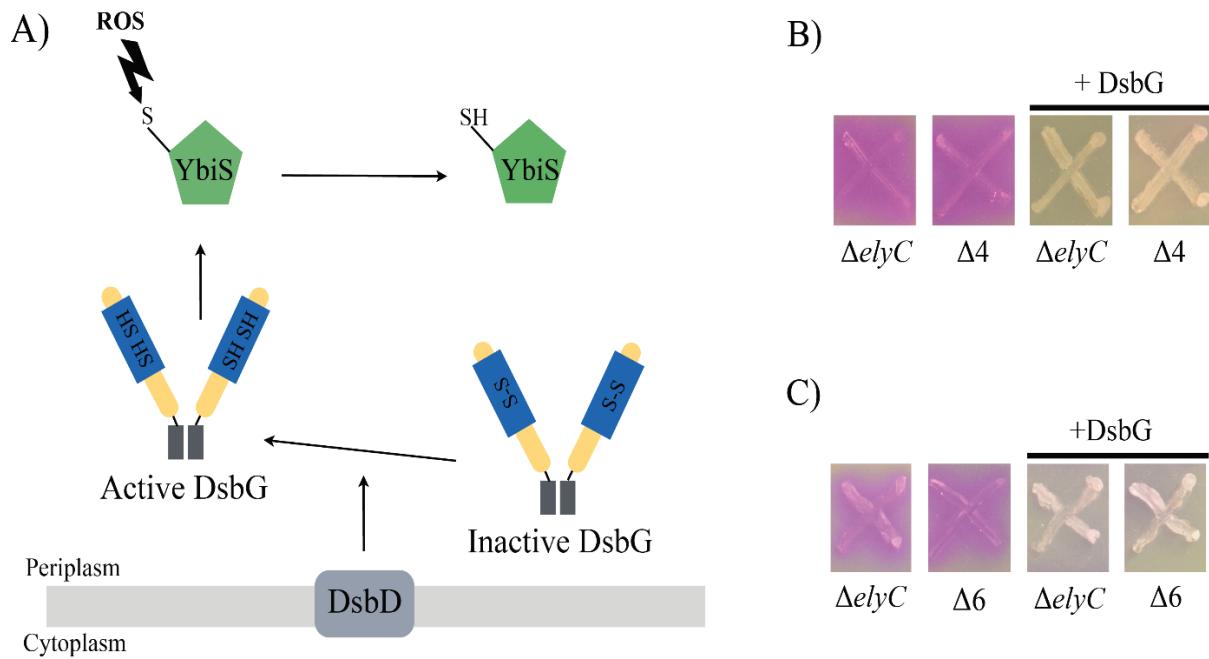
## **Acknowledgments**

We would like to thank Dr. Marc Drolet and Rim Marrakchi for critical reading of the manuscript and Gabrielle Gendron-Lepage in assisting in obtaining of CPRG images and helping with the isolation of aggregated proteins.

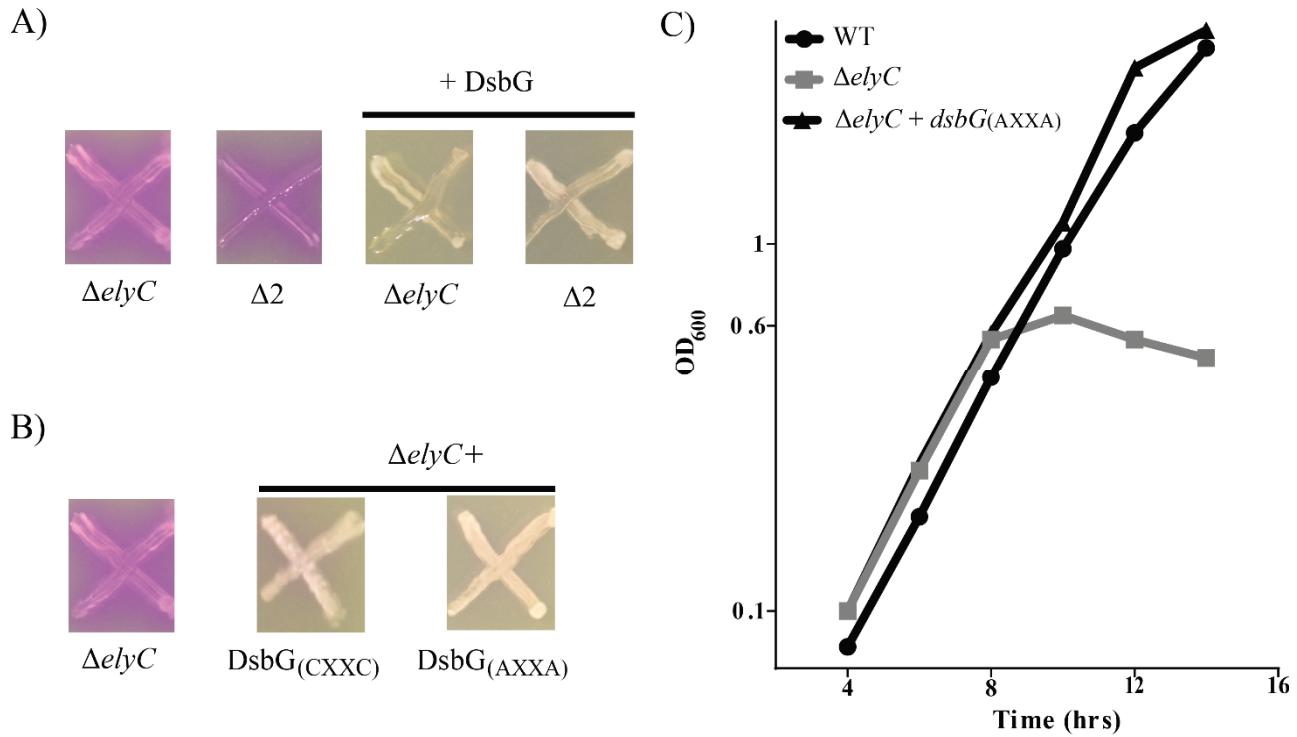
## Figures



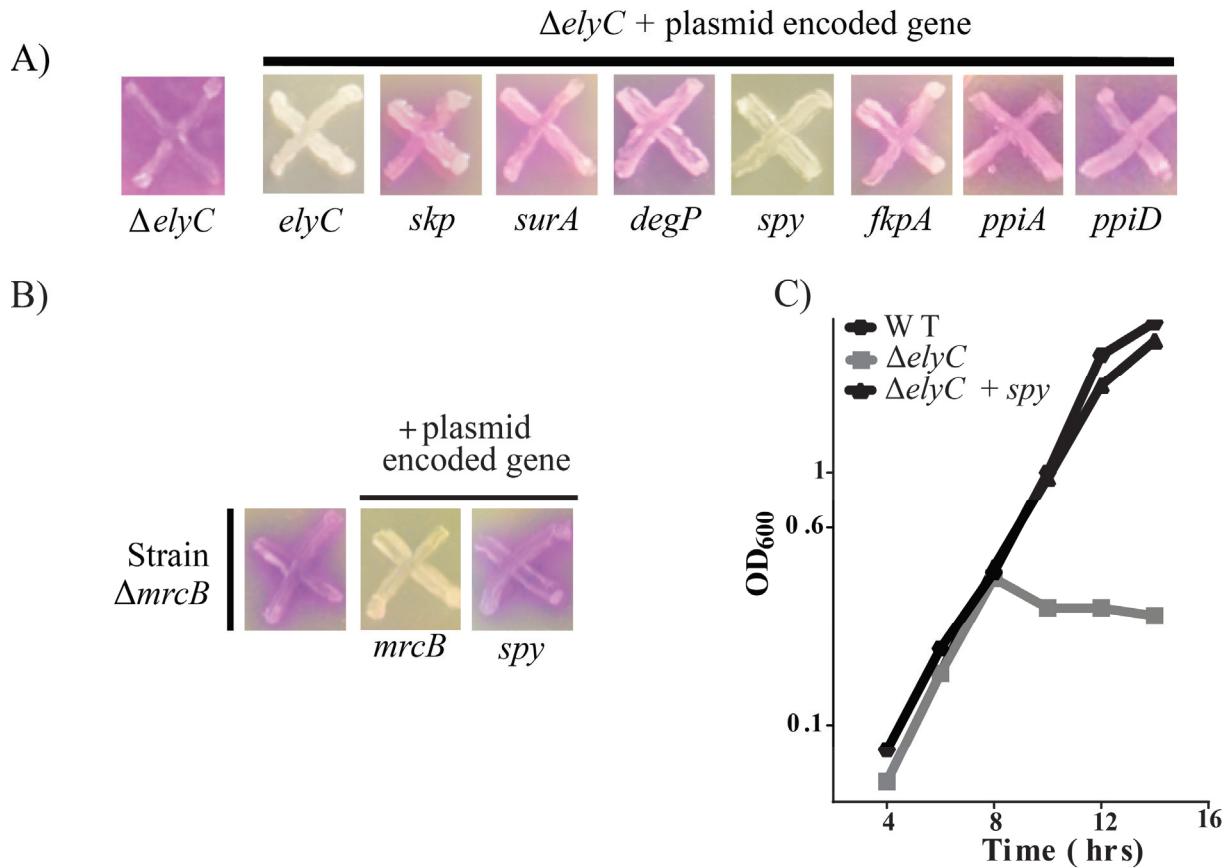
**Figure 1. Overexpression of the periplasmic reductase DsbG suppresses the  $\Delta elyC$  mutant lysis phenotype.** (A) Screening for the  $\Delta elyC$  genetic suppressors with the CPRG assay. Cells from *E. coli* MG1655 wild-type strain (WT),  $\Delta elyC$  mutant and  $\Delta elyC$  mutant carrying the identified multi-copy plasmids encoding genes were patched onto LB agar supplemented with CPRG (20 ug/ml) and IPTG (100 uM) and grew for overnight at 21°C. (B) Testing the DsbG suppression effect specificity with the CPRG assay.  $\Delta mrcB$  mutant cell carrying or not the multi-copy plasmids with *mrcB* or *dsbG* coding genes were grown on CPRG plate and incubated overnight at 21°C. (C) Testing the DsbG suppression effect in LB liquid medium. The growth curve of the WT,  $\Delta elyC$  and  $\Delta elyC$  cells carrying plasmid encoding *dsbG* was carried out as described in Material and Methods. Strain: MG1655 (WT), EM9 ( $\Delta elyC$ ) and MM39 ( $\Delta mrcB$ ).



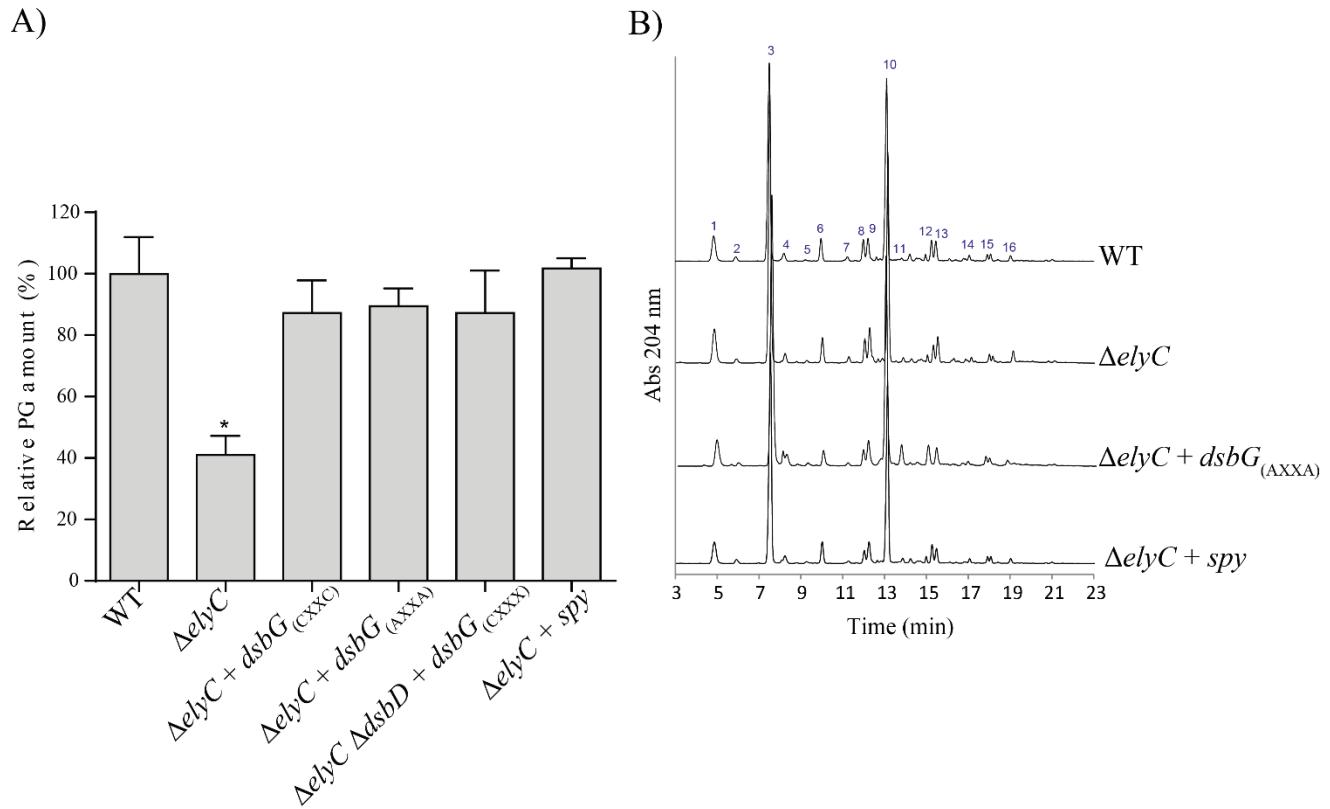
**Figure 2. DsbG does not act on the L,D-transpeptidases to suppress the  $\Delta elyC$  lysis phenotype.** (A) Catalytic Mechanism of DsbG reductase. DsbG is translocated to the periplasm where it forms a V-Shaped dimeric protein with a thioredoxin fold and CX<sub>2</sub>C motif. The two cysteines of the active site form a disulfide bond (S-S), when DsbG is inactivated. DsbD, which is inner membrane reductase protein, maintains the cysteines of DsbG in a reduced stage (SH-SH). Active DsbG its turns reduces the single cysteine-containing protein such as the L,D-transpeptidase YbiS to protects this catalytic cysteine from the oxidizing ROS and activates the protein. Arrows represent reduction mechanism. CPRG assay of (B) The  $\Delta elyC$  and the  $\Delta 4$  ( $\Delta elyC \Delta ybiS \Delta ynhG \Delta erfK$ ) mutants with or without the plasmid encoding DsbG (C) The  $\Delta elyC$  and the  $\Delta 6$  ( $\Delta elyC \Delta ybiS \Delta ynhG \Delta erfK \Delta ycbB \Delta ycf$ ) mutants with or without the plasmid encoding DsbG. Strain: IK6 ( $\Delta elyC \Delta ybiS \Delta ynhG \Delta erfK$ ) and IK15 ( $\Delta elyC \Delta ybiS \Delta ynhG \Delta erfK \Delta ycbB \Delta ycf$ ).



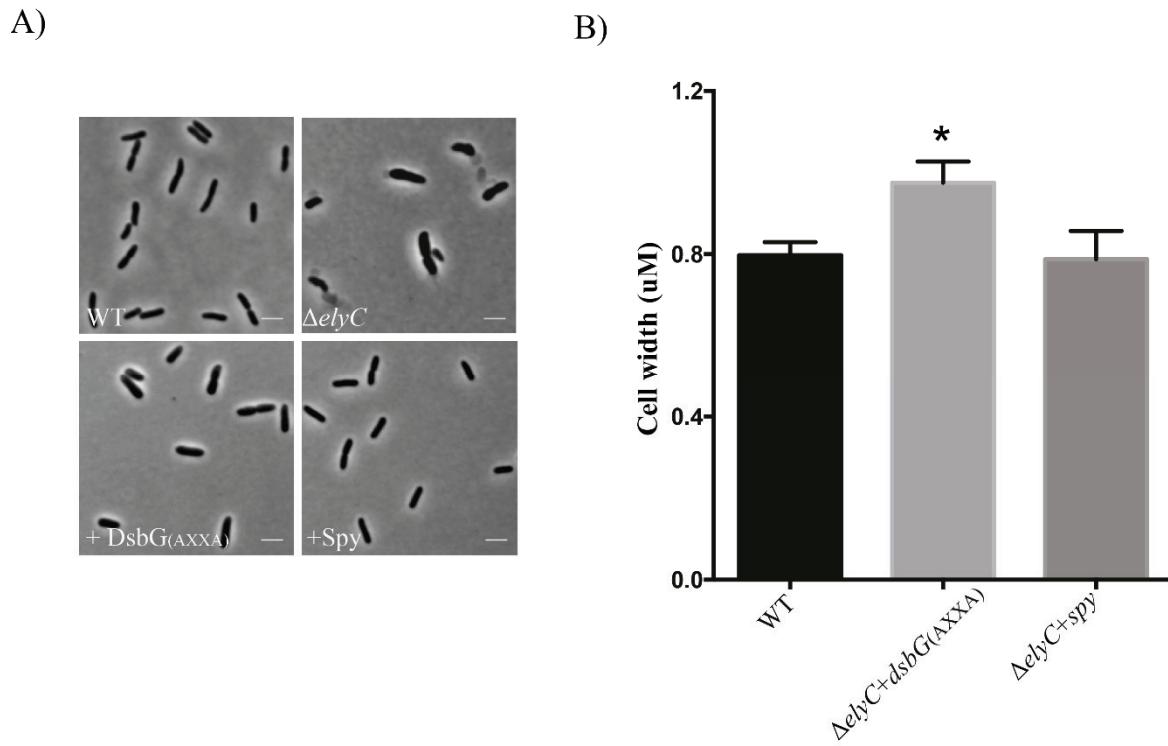
**Figure 3. DsbG does not act by its reductase activity.** CPRG assay of (A) The  $\Delta elyC$  and the  $\Delta elyC \Delta dsbD$  mutants both with or without the plasmid encoding DsbG. (B)  $\Delta elyC$  and  $\Delta elyC$  carrying the plasmid encoding DsbG(CXXC) native form or the plasmid encoding DsbG(AXXA) catalytic mutant. (C) Growth curve in LB liquid medium of the WT,  $\Delta elyC$  and  $\Delta elyC$  carrying the multi-copy plasmid coding for DsbG(AXXA) catalytic mutant. Strain: MG1655 (WT), EM9 ( $\Delta elyC$ ) and IK16 ( $\Delta elyC \Delta dsbD$ ).



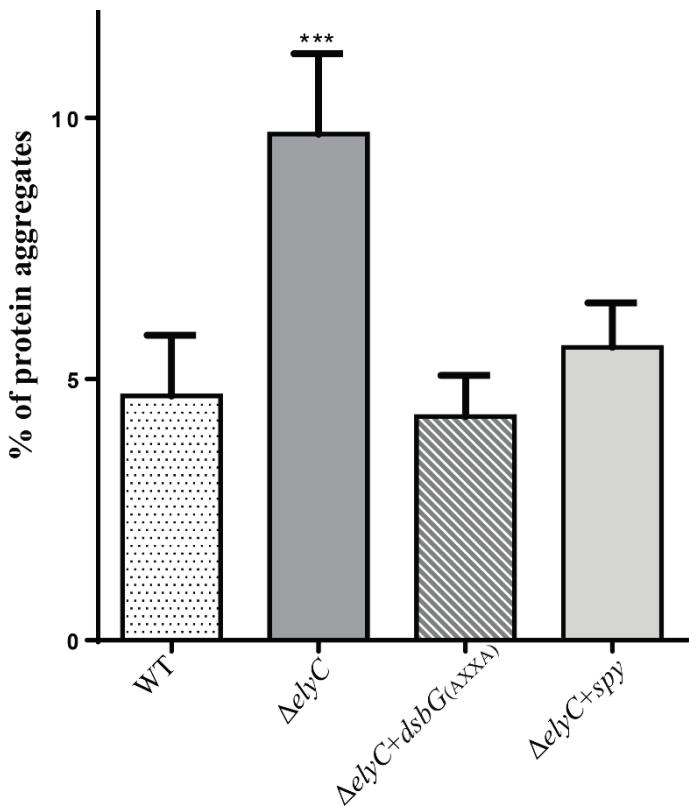
**Figure 4. Overexpression of the periplasmic chaperone Spy suppresses the  $\Delta elyC$  mutant lysis defect at 21°C.** (A) CPRG screen for periplasmic protein folding helper as a  $\Delta elyC$  genetic suppressors. Cells of  $\Delta elyC$  and  $\Delta elyC$  carrying individually the identified multi-copy plasmid from the Mobile plasmid library were patched onto CPRG indicator. (B) CPRG assay of the Spy suppression effect specificity. Cells of  $\Delta elyC$  and  $\Delta mrcB$  carrying or not the multi-copy plasmid encoding *dsbG* were grown on LB agar with CPRG and IPTG. (C) Growth curve in LB liquid medium of the WT,  $\Delta elyC$  and  $\Delta elyC$  carrying plasmid with *spy* coded gene monitored as described in experimental procedure. Strain: MG1655 (WT), EM9 ( $\Delta elyC$ ).



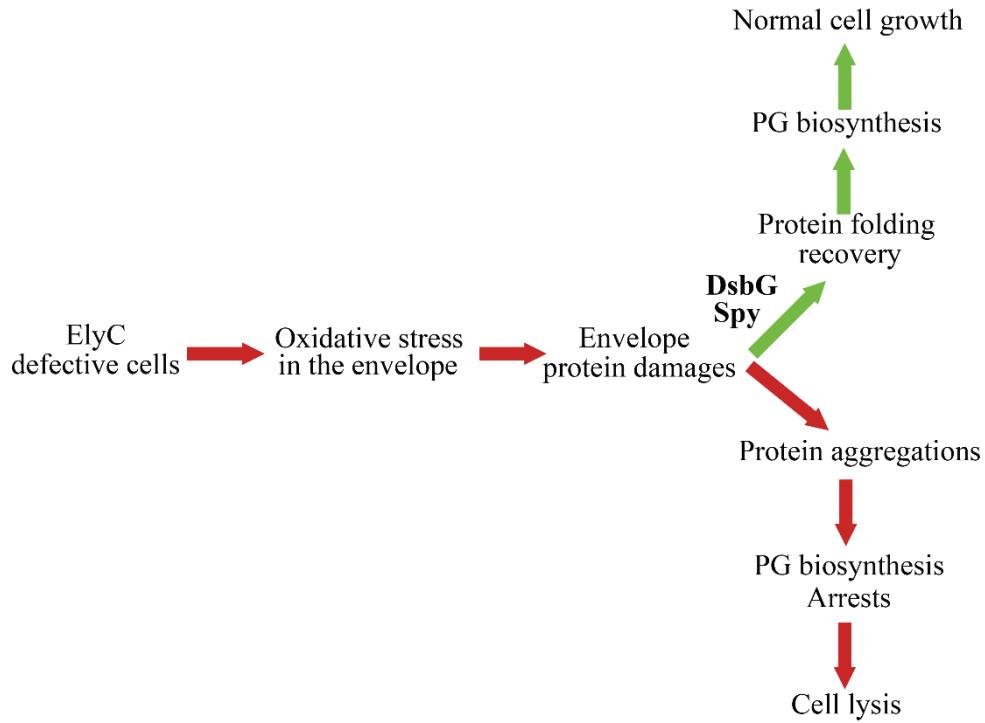
**Figure 5. The overexpression of DsbG and Spy restores the peptidoglycan biosynthesis in the  $\Delta elyC$ .** (A) The data presents the relative PG amount after UPLC analysis of the WT,  $\Delta elyC$  and  $\Delta elyC$  cells carrying individually plasmids with DsbG(CXXC), DsbG(AXXA) or Spy and  $\Delta elyC \Delta dsbD$  cell carrying the plasmid encoding DsbG(CXXC). The cells were grown in LB liquid medium at 21°C until OD<sub>600</sub> of 0.5 and the PG was isolated and prepared for the UPLC analysis as described in experimental procedure. The total PG amount were calculated from the total intensity detected in UPLC and the relative amount of PG were then determined by using the wild-type strain as the reference. Mean  $\pm$  SEM. Asterisks indicate significant differences compared to the WT. (p-value < 0.05). (B) Chromatographic representation of the muramidase-digested PG samples of the WT,  $\Delta elyC$  and  $\Delta elyC$  cells carrying individually plasmids with DsbG(AXXA) or Spy. The cell growth and the samples preparation and analysis was done as described in Figure 5A. Data shown are the UV absorption profiles of the eluted muropeptides in triplicate. Important peaks are labeled by numbers and the corresponding muropeptides are indicated in Table S1.



**Figure 6. Microscopic analysis of cell shape reveal that DsbG overexpression causes the  $\Delta\text{elyC}$  mutant cells to widen.** (A) Phase-contrast micrograph showed that the  $\Delta\text{elyC}$  cells with DsbG<sub>(AXXA)</sub> overexpression are widen. Cells were grown in LB medium at 21°C until OD<sub>600</sub> of 0.5, 3  $\mu\text{l}$  of cells were placed onto 0.8% agar pads and analysed by phase-contrast microscopy as described in experimental procedure. The sign “+” marked the  $\Delta\text{elyC}$  cells which overexpressed the protein indicated next. The white bar represents 3  $\mu\text{M}$ . (B) Average cell width variation showed  $\Delta\text{elyC}$  cells with DsbG<sub>(AXXA)</sub> overexpression significantly widen. Cells were grown as described in Fig 6A and cells width were calculated from phase-contrast micrographs using the image processing software Fiji. Three independent experiments were done and one hundred cells from each experiment were calculated. Statistical analysis for data was made comparatively to WT cells. Asterisks indicate significant differences ( $p\text{-value}<0.05$ ).



**Figure 7. The relative amount of protein aggregates.** This figure represents the average of protein aggregates calculated from six independent experiments. The protein aggregates were isolated from the WT,  $\Delta elyC$  and  $\Delta elyC$  cells carrying individually plasmids with DsbG(AXXA) or Spy as described in Experimental procedure. The amount of aggregated proteins was measured by Bradford assay and the percentage of aggregation was calculated from the total protein concentration. Statistical analysis for data was made comparatively to WT cells. Asterisks indicate significant differences ( $p$ -value $< 0.05$ ).



**Figure 8. Speculative Model.** The oxidative stress in the envelope compartment of the ElyC defective cells, might cause protein damages that lead to the inactivation and the aggregation of these proteins. Among stress-damaged proteins, there may be enzymes involve in PG biosynthesis pathway, which will block of the process and lead to cell lysis. DsbG and Spy's overproduction would prevent protein aggregation and assist refolding of damaged proteins. Thus, by restoring the protein folding defect, DsbG and Spy correct the PG biosynthesis problem and avoid cell lysis.

## Supplementary Materials

**Table S1.** Muropeptide corresponding peaks.

Peak	Muropep.	Structure
1	M3	GlcNAc-MurNAc-L-Ala-D-Glu-DAP
2	M4 <sup>G</sup>	GlcNAc-MurNAc-L-Ala-D-Glu-DAP-Gly
3	M4	GlcNAc-MurNAc-L-Ala-D-Glu-DAP-D-Ala
4	M2	GlcNAc-MurNAc-L-Ala-D-Glu
5	M5	GlcNAc-MurNAc-L-Ala-D-Glu-DAP-D-Ala-D-Ala
6	M3Lpp	GlcNAc-MurNAc-L-Ala-D-Glu-DAP-Lys-Thr (Brown's lipoprotein)
7	D33	M3-M3 (crosslinked at DAP-DAP)
8	D34	M3-M4 (crosslinked at DAP-DAP)
9	D43	M4-M3 (crosslinked at D-Ala-DAP)
10	D44	M4-M4 (crosslinked at D-Ala-DAP)
11	D45	M4-M5 (crosslinked at D-Ala-DAP)
12	D43Lpp	M4-M3Lpp (crosslinked at D-Ala-DAP)
13	T444	M4-M4-M4 (crosslinked at D-Ala-DAP and D-Ala-DAP)
14	D43N	M4-M3 anhydro (crosslinked at D-Ala-DAP)
15	D44N	M4-M4 anhydro (crosslinked at D-Ala-DAP)
16	T444N	M4-M4-M4 anhydro (crosslinked at D-Ala-DAP and D-Ala-DAP)

**Table S2.** Muropeptide relative abundance.

Peak	Muropep.	WT	$\Delta elyC$	$\Delta elyC$ +dsbG	$\Delta elyC$ +dsbG <sub>(AXXA)</sub>	$\Delta elyC$ +dsbG	$\Delta dsbD$	$\Delta elyC$ +spy
1	M3	9.27	10.22	6.51	7.29	6.66		7.73
2	M4G	1.18	0.80	0.58	0.68	0.68		1.11
3	M4	50.35	52.78	56.12	55.83	55.65		54.00
4	M2	2.29	1.79	2.10	1.76	2.34		1.97
5	M5	0.00	0.00	2.29	2.04	2.30		0.00
6	M3Lpp	5.13	4.74	2.81	2.79	2.81		4.91
7	D33	0.42	0.53	0.18	0.24	0.17		0.22
8	D34	2.25	2.35	1.01	1.33	0.94		1.37
9	D43	2.79	3.37	2.37	2.57	2.41		2.70
10	D44	20.43	18.26	19.06	19.21	19.39		20.87
11	D45	0.64	0.27	2.29	1.79	2.19		0.39
12	D43Lpp	2.03	1.45	1.96	1.83	2.00		1.87
13	T444	1.43	1.57	1.01	0.98	0.80		1.06
14	D43N	0.40	0.29	0.36	0.33	0.32		0.34
15	D44N	1.00	0.97	1.11	1.10	1.07		1.14
16	T444N	0.36	0.62	0.25	0.24	0.28		0.30

**Table S3.** Muropeptide composition.

Parameter	WT	$\Delta elyC$	$\Delta elyC +dsbG$	$\Delta elyC +dsbG(AXXA)$	$\Delta elyC \Delta dsbD +dsbG$	$\Delta elyC +spy$
Monomers	68.23	70.33	70.41	70.38	70.44	69.74
Dimers	29.98	27.48	28.33	28.41	28.47	28.90
Trimers	1.79	2.19	1.27	1.21	1.08	1.36
Di	2.29	1.79	2.10	1.76	2.34	1.97
Tri	14.83	15.50	9.50	10.32	9.64	12.87
Tetra	82.24	82.45	83.83	84.09	83.53	84.77
Penta	0.64	0.27	4.58	3.84	4.49	0.39
Lpp	7.17	6.19	4.76	4.62	4.81	6.78
Anhydro	1.75	1.88	1.72	1.67	1.67	1.77
Crosslink	33.56	31.85	30.86	30.83	30.64	31.62

**Table S4.** Strains used in this study.

Strain	Genotype <sup>a</sup>	Source/Reference <sup>b</sup>
MG1655	<i>rphI ilvG rfb-50</i>	(Guyer <i>et al.</i> , 1981)
EM1	<i>MG1655 ΔelyC::Kan<sup>R</sup></i>	(Paradis-Bleau <i>et al.</i> , 2014)
EM9	<i>MG1655 ΔelyC::frt</i>	(Paradis-Bleau <i>et al.</i> , 2014)
MM39	<i>MG1655 ΔmrcB::frt</i>	Thomas G. Bernhardt's Lab
CB154	<i>MG1655 ΔelyC::Cam<sup>R</sup></i>	(Paradis-Bleau <i>et al.</i> , 2014)
CB241	<i>MG1655 ΔycfS::Kan<sup>R</sup></i>	Thomas G. Bernhardt's Lab
CB331	<i>MG1655 ΔynhG::frt</i>	Thomas G. Bernhardt's Lab

JFC329	MG1655 $\Delta dsbD::Cam^R$	Jean Francois Collet's Lab
JW0803-7	BW35113 $\Delta ybiS::Kan^R$	(Baba <i>et al.</i> , 2006)
JW1968-1	BW35113 $\Delta erfK::Kan^R$	(Baba <i>et al.</i> , 2006)
IK1	MG1655 $\Delta ynhG::frt \Delta ybiS::Kan^R$	CB331 X P1(JW0803-7)
IK3	MG1655 $\Delta ynhG::frt \Delta ybiS::frt$	Excision of Kan with pCP20
IK5	MG1655 $\Delta ynhG::frt \Delta ybiS::frt \Delta erfK::Kan^R$	IK3 X P1(JW1968-1)
IK6	MG1655 $\Delta ynhG::frt \Delta ybiS::frt \Delta erfK::Kan^R \Delta elyC::Cam^R$	IK5 X P1(CB154)
IK7	MG1655 $\Delta ynhG::frt \Delta ybiS::frt \Delta erfK::frt$	Excision of Kan with pCP20
IK8	MG1655 $\Delta ynhG::frt \Delta ybiS::frt \Delta erfK::frt \Delta ycfS::Kan^R$	IK7 X P1(CB241)
IK9	MG1655 $\Delta ynhG::frt \Delta ybiS::frt \Delta erfK::frt \Delta ycfS::frt$	Excision of Kan with pCP20
IK14	MG1655 $\Delta ynhG::frt \Delta ybiS::frt \Delta erfK::frt \Delta ycfS::frt \Delta ycbB::Kan$	IK9 X P1(CB243)
IK15	MG1655 $\Delta ynhG::frt \Delta ybiS::frt \Delta erfK::frt \Delta ycfS::frt \Delta ycbB::Kan \Delta elyC::Cam$	IK14 X P1(CB154)
IK16	MG1655 $\Delta elyC::Kan^R \Delta dsbD::Cam^R$	EM1 XP1(JFC329)

- a. The 'JW' strains are from the KEIO collection (Baba *et al.*, 2006)
- b. Strain constructions by P1 transduction are described as recipient x P1(donor).

**Table S5.** Plasmids used in this study.

Plasmid	Genotype	Origin	Sources and Reference
pIK4	<i>bla</i> $P_{\text{tac}} :: dsbG(\text{AXXA})$	lacIq pBR	This work
ORF plasmid encoding <i>elyC</i>	<i>bla lacIq P_{\text{tac}} :: elyC</i>	pBR	(Saka <i>et al.</i> , 2005)
ORF plasmid encoding <i>gor</i>	<i>bla lacIq P_{\text{tac}} :: gor</i>	pBR	(Saka <i>et al.</i> , 2005)
ORF plasmid encoding <i>grx1</i>	<i>bla lacIq P_{\text{tac}} :: grx1</i>	pBR	(Saka <i>et al.</i> , 2005)
ORF plasmid encoding <i>grx2</i>	<i>bla lacIq P_{\text{tac}} :: grx2</i>	pBR	(Saka <i>et al.</i> , 2005)
ORF plasmid encoding <i>grx3</i>	<i>bla lacIq P_{\text{tac}} :: grx3</i>	pBR	(Saka <i>et al.</i> , 2005)
ORF plasmid encoding <i>tr</i>	<i>bla lacIq P_{\text{tac}} :: tr</i>	pBR	(Saka <i>et al.</i> , 2005)
ORF plasmid encoding <i>trx1</i>	<i>bla lacIq P_{\text{tac}} :: trx1</i>	pBR	(Saka <i>et al.</i> , 2005)
ORF plasmid encoding <i>trx2</i>	<i>bla lacIq P_{\text{tac}} :: trx2</i>	pBR	(Saka <i>et al.</i> , 2005)
ORF plasmid encoding <i>dsbA</i>	<i>bla lacIq P_{\text{tac}} :: dsbA</i>	pBR	(Saka <i>et al.</i> , 2005)
ORF plasmid encoding <i>dsbB</i>	<i>bla lacIq P_{\text{tac}} :: dsbB</i>	pBR	(Saka <i>et al.</i> , 2005)
ORF plasmid encoding <i>dsbC</i>	<i>bla lacIq P_{\text{tac}} :: dsbC</i>	pBR	(Saka <i>et al.</i> , 2005)
ORF plasmid encoding <i>dsbD</i>	<i>bla lacIq P_{\text{tac}} :: dsbD</i>	pBR	(Saka <i>et al.</i> , 2005)
ORF plasmid encoding <i>dsbG</i>	<i>bla lacIq P_{\text{tac}} :: dsbG</i>	pBR	(Saka <i>et al.</i> , 2005)
ORF plasmid encoding <i>ccmG</i>	<i>bla lacIq P_{\text{tac}} :: ccmG</i>	pBR	(Saka <i>et al.</i> , 2005)

ORF plasmid encoding <i>mrcB</i>	<i>bla lacIq P<sub>tac</sub>::mrcB</i>	pBR	(Saka <i>et al.</i> , 2005)
ORF plasmid encoding <i>skp</i>	<i>bla lacIq P<sub>tac</sub>::skp</i>	pBR	(Saka <i>et al.</i> , 2005)
ORF plasmid encoding <i>surA</i>	<i>bla lacIq P<sub>tac</sub>::surA</i>	pBR	(Saka <i>et al.</i> , 2005)
ORF plasmid encoding <i>degP</i>	<i>bla lacIq P<sub>tac</sub>::degP</i>	pBR	(Saka <i>et al.</i> , 2005)
ORF plasmid encoding <i>spy</i>	<i>bla lacIq P<sub>tac</sub>::spy</i>	pBR	(Saka <i>et al.</i> , 2005)
ORF plasmid encoding <i>fkpA</i>	<i>bla lacIq P<sub>tac</sub>::fkpA</i>	pBR	(Saka <i>et al.</i> , 2005)
ORF plasmid encoding <i>ppiA</i>	<i>bla lacIq P<sub>tac</sub>::ppiA</i>	pBR	(Saka <i>et al.</i> , 2005)
ORF plasmid encoding <i>ppiD</i>	<i>bla lacIq P<sub>tac</sub>::ppiD</i>	pBR	(Saka <i>et al.</i> , 2005)

---

**Table S6.** Primers used in this study.

Primer	Sequence (5' to 3')	Used for
DsbG(AXXA)_FW	GTTCGCCCCATATGCTAACACAGTTCTG	Construction of pIK4
DsbG(AXXA)_RV	GGATCGGCGAAGACGTAGACAATGAC	Construction of pIK4
<i>dsbA</i> -Fwd	GATAAAAGCCGAGCAGCGGATG	Verification of gene deletion
<i>dsbA</i> -Rev	CGACACCCAGGCTGAATTGCG	Verification of gene deletion
<i>dsbB</i> -Fwd	ATTCGCCTCTCTTATGGCCGC	Verification of gene deletion
<i>dsbB</i> -Rev	CAAAAAGCGGGCGTGATGCT	Verification of gene deletion
<i>dsbC</i> -Fwd	AGATGACGCGACAGACCTTCT	Verification of gene deletion
<i>dsbC</i> -Rev	GTCGGCGTCGAAATCACCGA	Verification of gene deletion
<i>dsbD</i> -Fwd	ATTATTGACGCGCCGGGAC	Verification of gene deletion
<i>dsbD</i> -Rev	CCTGATAACGTGCCAGCAGC	Verification of gene deletion
<i>dsbG</i> -Fwd	CTTTGTGAACTTGCACCGCCAG	Verification of gene deletion
<i>dsbG</i> -Rev	GAGATTGGCCATACACTACTCCGG	Verification of gene deletion

<i>erfK</i> -Fwd	ATTCCTTCTCACCTGTCG GCAG	Verification of gene deletion
<i>erfK</i> -Rev	TCGCGTTCCCCTGCCCTATA	Verification of gene deletion
<i>ycbB</i> -Fwd	GGAAC TGACGAAGCGCCTTC	Verification of gene deletion
<i>ycbB</i> -Rev	GGGGTAGAGAGTGTTGCAAACG	Verification of gene deletion
<i>ycfS</i> -Fwd	GGCCTGGTTGATTGGTTGCT	Verification of gene deletion
<i>ycfS</i> -Rev	ATGTCATTGCCAGCTTGCG	Verification of gene deletion
<i>ybiS</i> -Fwd	CGCCGCCAAATTGACGGAA	Verification of gene deletion
<i>ybiS</i> -Rev	GCTGA ACTATGTGCCGCCGT	Verification of gene deletion
<i>ynhG</i> -Fwd	ACGATCAGATGACGCCGCAG	Verification of gene deletion
<i>ynhG</i> -Rev	GCGCGGTAATCCTGGGTTCTAC	Verification of gene deletion
<i>elyC</i> -Fwd	AGCATCCAGCACACGCAGTT	Verification of gene deletion
<i>elyC</i> -Rev	CGCAGCATGTTGAAAGATT CGC	Verification of gene deletion
<i>spy</i> -Fwd	CGTGTGTAATATTCTCTCATCACTCTCCA	Verification of gene deletion
<i>spy</i> -Rev	TGGGAAC GTGCAAATT CGC	Verification of gene deletion



Δ3



Δ5

**Figure 1S.** CPRG Phenotype of the strains, Δ3 ( $\Delta ybiS \Delta ynhG \Delta erfK$ ); and Δ5 ( $\Delta ybiS \Delta ynhG \Delta erfK \Delta ycbB \Delta ycf$ ) at 21°C.

## References for Supplementary Materials

- Baba, T., T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K.A. Datsenko, M. Tomita, B.L. Wanner & H. Mori, (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular systems biology* **2**: 2006 0008.
- Guyer, M.S., R.R. Reed, J.A. Steitz & K.B. Low, (1981) Identification of a sex-factor-affinity site in *E. coli* as gamma delta. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **45 Pt 1**: 135-140.
- Paradis-Bleau, C., G. Kritikos, K. Orlova, A. Typas & T.G. Bernhardt, (2014) A genome-wide screen for bacterial envelope biogenesis mutants identifies a novel factor involved in cell wall precursor metabolism. *PLoS genetics* **10**: e1004056.
- Saka, K., M. Tadenuma, S. Nakade, N. Tanaka, H. Sugawara, K. Nishikawa, N. Ichiyoshi, M. Kitagawa, H. Mori, N. Ogasawara & A. Nishimura, (2005) A complete set of *Escherichia coli* open reading frames in mobile plasmids facilitating genetic studies. *DNA Res* **12**: 63-68.

## Préface au Chapitre 3

Les phénotypes causés par l'absence du facteur ElyC ont été caractérisés à température pièce. À 37°C, le mutant  $\Delta elyC$  ne présente pas de défaut de croissance contrairement à 21°C. De ce fait, le phénotype du mutant  $\Delta elyC$  n'a pas été davantage caractérisé à 37°C. Il est donc difficile de dire si ce facteur a un rôle à 37°C. Dans cette étude nous avons caractérisé le phénotype à 37°C et nous avons analysé les changements transcriptionnels induits par l'inactivation de ElyC à 37°C et 21°C. Nous avons démontré que la biosynthèse du peptidoglycane chez le mutant  $\Delta elyC$  est aussi affectée à 37°C, et que le mutant est plus sensible aux  $\beta$ -lactamines qui ciblent le PG à cette température. Cependant, le défaut de PG est plus prononcé à 21°C qu'à 37°C, et le mutant ne lyse qu'à 21°C. De plus, l'analyse transcriptionnelle a révélé une forte induction de la réponse au stress dans l'enveloppe à 21°C, contrairement à 37°C, où la réponse est plus modérée. Nos résultats démontrent que ElyC est important aux deux températures, en revanche, son absence induit un phénotype plus sévère à basse température. Cet article a été envoyé aux coauteurs pour révision puis il sera soumis aux pairs dans le but de le publier dans la revue « Journal of Bacteriology »

**Article II : Kouidmi, I., Alvarez, L., Cava, F., and Paradis-Bleau, C.** A phenotypic and transcriptomic characterization of the ElyC defective *Escherichia coli* cells, reveal the importance of this factor in peptidoglycan biosynthesis at high and low temperature.

Contribution des auteurs : Le projet a été élaboré par Dr Catherine-Paradis Bleau et moi. Comme premier auteur de cet article ma contribution a été significative. J'ai réalisé plus que la moitié des expériences. J'ai procédé à l'analyse des résultats et à la préparation des figures. J'ai rédigé l'article. Les corrections ont été apportées par mon co-directeur Dr Marc Drolet

## **CHAPITRE 3: Article II**

**Phenotypic and transcriptomic characterization of the ElyC defective *Escherichia coli* cells, reveal the importance of this factor in peptidoglycan biosynthesis at high and low temperature**

Imène Koudmi, Laura Alvarez, Felipe Cava, and Catherine Paradis-Bleau

Running title: Importance of ElyC at high and low temperatures

Keys Words: Peptidoglycan, ElyC, low/high temperature, RNAseq, envelope stress response systems.

## **Abstract**

Peptidoglycan (PG) is the main structural component of bacterial cell envelopes. It protects the bacteria against variations in osmotic pressure and confers cell shape. A defect at its level induces cell lysis, thus, the pathway of PG biosynthesis represents an excellent therapeutic target. In a previous study, a newly discovered *Escherichia coli* factor, named ElyC, was shown to be important for PG biosynthesis at low temperature. In the ElyC defective cells growing at low temperature, the PG biosynthesis was totally blocked, and the cells lyse. The impact of the absence of the ElyC factor on cells growing at high temperature (37°C) was not yet investigated. Here, we study the phenotypic and the transcriptomic difference between the  $\Delta$ *elyC* mutant cells growing at low temperature (21°C) and at 37°C. We showed that PG biosynthesis is also affected at 37°C and that the mutant cells are more sensitive to  $\beta$ -lactam antibiotics at this temperature. However, the PG defect is less pronounced at 37°C than at 21°C, which avoid cell lysis at 37°C. Moreover, we found that the absence of ElyC leads to the activation of an important envelope stress response at 21°C, contrary to 37°C, where the response was present but moderated. Several downregulated genes, at both temperatures, were shown to be involved in cellular functions taking place in the envelope compartment and mainly at the level of the inner membrane, suggesting a defect in this compartment. Based on our results we suggest that the flux of PG synthesis through the inner membrane is affected by the absence of ElyC at both temperatures. The cold sensitive depending phenotype could be the consequence of certain physiological changes occurring at low temperature such as compositional modification of the inner membrane phospholipids, which might slow the PG biosynthesis process or totally block it.

## **Importance**

Targeting the peptidoglycan biosynthesis pathway leads to bacterial cell lysis. This makes the pathway for PG assembly an ideal target for antibacterial compounds. However, PG assembly in the envelope compartment is not well understood. The ElyC factor gene deletion showed a considerable decrease in the amount of PG that was more pronounced at 21 than at 37°C. This defect is correlated with cell lysis at 21 but not at 37°C. Our study reveals for the first time the importance of ElyC in PG biosynthesis at 37°C and highlight a new cold sensitive process of the PG production, which could be targeted to inhibit PG biogenesis.

## Introduction

The bacterial cell envelope is the first and major line of defense against threats from external hostile environments. It controls signal transduction and allows selective passage of nutrients from the outside and waste products from the inside. The envelope of Gram-negative bacteria is a complex organelle that consists of an inner and an outer membrane separated by the periplasmic space, which contains a thin layer of peptidoglycan. Each compartment has its own organization, composition and functions, which make the envelope a remarkable cellular structure.

The outer membrane (OM) is an asymmetrical lipid bilayer composed of phospholipid in the inner leaflet and mainly lipopolysaccharides (LPS<sub>s</sub>) in the outer leaflet (1). We distinguish two classes of proteins in the OM, the lipoproteins and the  $\beta$ -barrel proteins. (2-4). The most abundant lipoproteins in *E. coli* are the Braun lipoproteins (Lpp<sub>s</sub>). The Lpp<sub>s</sub> are linked to the peptidoglycan by their protein moiety and to the OM by their lipid moiety (4, 5). The high abundant integral outer membrane  $\beta$ -barrel proteins (OMPs) are mainly porins and are involved in passive transport of small molecules. The number of enzymes present in the OM is limited. As an example, a protease (OmpT), a LPS modification enzyme (PagP) or a phospholipase (PlaA). However, the deletion of any of these enzymes shows no striking phenotype (2, 4). Thus, the main known function of the OM is to serve as a protective barrier. Unlike the OM, the inner membrane (IM) is a symmetric phospholipid bilayer with helical-type proteins and lipoproteins. The IM plays several essential physiological functions. Among these functions, it drives energy production through the proton gradient created via the electron transfer chain. This allows the production of the proton motive force in the IM and the ATP in the cytoplasm (3). The inner membrane is also the compartment where the envelope proteins are inserted or passed through to reach their destination. The major route for these proteins is the Sec translocase, which is a multimeric membrane protein complex comprised of SecY, SecE and SecG that form a protein-conducting channel. The SecYEG translocase is coupled to the ATPase-driven motor protein SecA and the accessory complex protein SecDF-YajC. The IM proteins are inserted into the IM by the insertase YidC alone or coupled to the SecYEG translocase. The

protein translocation/insertion consume energy from ATP and proton motive force (PMF). The protein insertion could also use energy from polypeptide chain elongation at the ribosome.

Another main compartment of the Gram-negative bacterial envelope is the peptidoglycan, which is a unique and essential structure element of the bacteria cells. It encases the inner membrane to protect the cell from rupture by its internal turgor. The main structural feature of peptidoglycan is a long glycan strands made of alternating units of N-acetylglucosamine (GlcNAc) and N-acetylmuramic acid (MurNAc) cross-linked with a short peptides (6). The PG biosynthesis pathway is of central practical importance. Indeed, any inhibition of its biosynthesis induces cell lysis. The peptidoglycan biosynthesis process takes place in different cell compartments: the biosynthesis of the final lipid-linked precursor of the peptidoglycan (lipid II) started in the cytoplasm, is achieved in the inner leaflet of the inner membrane. The lipid II final product consists of the  $\beta$ 1, 4-linked GlucNAc and MurNAc, MurNAc is in turn linked to both the pentapeptide and the undecaprenyl phosphate lipid carrier (Und-P) (7). The lipid II is thereafter translocated to the outer leaflet of the inner membrane by the flipase MurJ (8) and integrated to the growing PG network by the high molecular weight Penicillin-Binding Proteins (PBPs) (9). These proteins are the targets of penicillin and other  $\beta$ -lactams related antibiotics.

Several advances were done to better understand the mechanism of PG biosynthesis but some steps remain least well-understood and specially at the level of the inner membrane. A recent study identified a new factor, named ElyC, important for PG biosynthesis at low temperature. The loss of ElyC was found to cause PG biosynthesis arrest after growth of 5.5 hours followed by cell lysis (10). ElyC is an inner membrane protein with two transmembrane domains and a highly conserved domain of unknown function (DUF218) (11). The role of ElyC is unclear and further complicating the picture is the observation that the mutant is altered at 21°C but grows normally in LB agar plates at 37°C. Genetic and physiological study of the  $\Delta$ elyC mutant phenotype at low temperature showed that the lysis phenotype is overcome by the overexpression of the lipid carrier synthase UppS and by the blockage of the Enterobacterial Commun Antigene (ECA) biosynthesis pathway, which also needs the lipid carrier. Based on these observations, it has been suggested that the mutant lacking ElyC could be impaired in the

lipid-carrying step of the peptidoglycan biosynthesis, which take place in the inner membrane (10).

As no phenotypic characterization of the  $\Delta elyC$  mutant growing at 37°C was done before, it is still unknown if ElyC is important for the cell and for PG production at this temperature or if it is just an important factor at low temperature. In this study, we investigated the importance of the ElyC at 37°C and analyse the phenotypic and the transcriptomic changes in the  $\Delta elyC$  growing at 21°C and 37°C.

We demonstrated that the PG amount significantly decreases at both temperatures, reaching 55% less at 21°C and 38% less at 37°C. This correlates with cell lysis at 21°C but not at 37°C. Moreover, at 37°C the  $\Delta elyC$  mutant cells were more sensitive to  $\beta$ -lactam antibiotics, which further confirms a defect at the level of PG. The transcriptomic analysis reveals an activation of an important envelope stress response at 21°C but this response was moderated at 37°C. This result correlates with the level of PG damages between the two temperatures and it suggests that the principal defect in the  $\Delta elyC$  mutant is in the envelope compartment. The downregulation of several genes involved in different inner membrane processes such as respiration, transporters or protein export suggest a perturbation at le level of the IM.

## **Materials and Methods**

### ***E. coli* strains and culture conditions.**

The strains used in this study are the *Escherichia coli* wild-type strain MG1655 (*rph1 ilvG rfb-50*) (12) and its derivative *elyC::frt* (EM9) (10) and *mrcB::frt* (MM39) (10). All experiments were performed in Luria-Bertani (LB) 1% NaCl medium at 21°C or 37°C with 250 rpm shaking. The pre-cultures were grown in LB medium at 37°C.

### **Assessment of growth phenotypes and microscopic analysis of cell shape.**

To monitor the growth of the  $\Delta elyC$  mutant in liquid media at 21°C and 37°C, overnight cultures of the wild-type and the  $\Delta elyC$  cells were diluted to an optical density (OD<sub>600</sub>) of 0.02 in LB 1% NaCl and grown with shaking. At an OD<sub>600</sub> of 0.5 (just before the decline in growth for the  $\Delta elyC$  mutant at 21°C) 3 µl aliquots were recovered and spotted on 0.8% agarose pads, and visualized by phase-contrast from Nikon Eclipse E600 microscope using a 100X oil immersion objective and a DS-Ri2 Nikon camera. Image analysis and cell width measurement were processed using Image J.

### **Peptidoglycan isolation and analysis by Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC).**

The wild-type and  $\Delta elyC$  overnight cultures were diluted to an OD<sub>600</sub> of 0.02 in 500 ml of LB 1% NaCl and grown at 21°C or 37°C with shaking. The cultures were harvested at an OD<sub>600</sub> of approximately 0.5. The PG was isolated using the boiling SDS method (13). PG samples were digested with pronase E (100 µg/ml) to remove Braun's lipoprotein. After addition of SDS 1% (w/v) (final concentration), reactions were heat-inactivated, and detergent was removed by additional washing steps. The samples were treated with muramidase (100 µg/ml) for 16 hours at 37°C. Muramidase digestion was stopped by boiling, coagulated proteins were removed by centrifugation (10 min, 14000 rpm) and the supernatants were reduced with 150 µl of 0.5 M sodium borate pH 9.5 and sodium borohydride (10 mg/ml final concentration, 30 min at low temperature). Finally, samples were adjusted to pH 3.5 with phosphoric acid.

UPLC analyses of muropeptides were performed on a Waters UPLC system (Waters Corporation, USA) equipped with an ACQUITY UPLC BEH C18 Column, 130Å, 1.7 µm, 2.1

mm X 150 mm (Waters, USA) and a dual wavelength absorbance detector. Elution of muropeptides was detected at 204 nm. Muropeptides were separated at 35°C using a linear gradient from buffer A (phosphate buffer 50 mM, pH 4.35) to buffer B (phosphate buffer 50 mM, pH 4.95, methanol 15% (v/v) in a 20 minutes run, with a 0.25 ml/min flow.

### **Statistical analysis.**

The program GraphPad PRISM® Software (Inc., San Diego CA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) has been used for cell width and peptidoglycan statistical analyses. To determine the significance of the data, the t-test (unpaired) has been performed for three independent replicates for cell width and PG analysis, respectively.

### **Determination of β-lactam antibiotics sensitivity.**

The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) values of different β-lactams against wild-type MG1655, EM9 ( $\Delta elyC$ ) and MM39 ( $\Delta mrcB$ ) strains were determined in LB 1% NaCl liquid media supplemented with different concentration of antibiotics as indicated. The cultures started at low concentration of bacteria ( $2 \times 10^6$  CFU/ml) and were grown at 37°C for 18h. The growth curve for β-lactams sensitivity was done as follow. The wild-type MG1655, EM9 ( $\Delta elyC$ ) and MM39 ( $\Delta mrcB$ ) strains were grown in LB 1% NaCl liquid media at 37°C with agitation. When the culture reached an OD<sub>600</sub> of 0.5, ampicillin or cephalexin was added to the concentration of 30 µg/ml.

### **Transcriptomic analysis by RNA-seq.**

Triplicate cultures of the wild-type and  $\Delta elyC$  mutant strains growing in LB 1% NaCl liquid media at 21°C and 37°C were harvested at an OD<sub>600</sub> of 0.30 to 0.35. Total RNA was isolated from these cultures using RNaesy Mini Kit (QIAGEN) with the RNAProtect Bacteria reagent (QIAGEN). DNA was removed using RNase-Free DNase set from QIAGEN. The RNA was finally resuspended in RNase-Free Water (QIAGEN) and quantified with NanoDrop ND-1000. Ribosome Integrity Numbers (RIN) of the RNA samples were determined with the Agilent Bioanalyzer 2100 employing RNA 6000 Pico Kit. The RIN numbers for all the twelve samples were 9.3 to 10. The rRNA depletion was performed using Ribo-Zero Magnetic Gold Kit for Gram-negative Bacteria (Illumina). RNAseq libraries were prepared using KAPA RNA

stranded Kit (Roche-Nimblegen) and sequenced on an Illumina HiSeq Platform. Poor quality reads were trimmed with Trimmomatic (14). The quality of the reads, before and after trimming, was assessed with FASTQC version 0. 11. 5. The reads were aligned to *E. coli* substrain MG1655 with Bowtie2 version 2. 2. 9 (15). The read counts for each gene was calculated using *featureCounts* 1.5.1 (16) and the differential expression was determined using the DESeq 2. 1. 14.0 (17). The comparative data for triplicates sample are provided in Excel files 1 and 2.

## Results

### Growth and cell morphology reveal no defect at 37°C for the *ΔelyC* mutant.

Previous work has shown that the *ΔelyC* mutant cells grew poorly and form very small colonies in agar plates. However, at 37°C the mutant grew normally in plate. Since these observations the phenotype of the *ΔelyC* cells was further investigated at 21°C by Paradis-Bleau *et al* (10). They showed that in a liquid media, the *ΔelyC* mutant cells grew as rapidly as wild-type MG1655 cells until late-exponential phase ( $OD_{600} \approx 0.6$ ) when they started to lyse. Microscopic analysis of the mutant cells revealed that the cells lysed via membrane blebs and further investigation revealed that the lysis phenotype is due to PG biosynthesis arrest (10). Here, we aimed to characterize the phenotype of the *ΔelyC* mutant at 37°C and investigated the phenotypic and the transcriptomic differences between the growth at low temperature (21°C) and 37°C.

We initiated our study by looking at the growth and cell morphology of the *ΔelyC* mutant at 21 vs 37°C. Growth was monitored in LB medium with 1% NaCl (see Materials and Methods). This concentration of salt exacerbates the phenotypes of the *ΔelyC* mutant at 21°C (10). As reported in previously (10), the *ΔelyC* mutant cell started to lyse at approximately 0.6 of  $OD_{600}$  at 21°C (Fig. 1A). However, at 37°C the mutant cells grew as well as the wild-type strain and did not lyse (Fig. 1B). The microscopic analysis of cells taken at  $OD_{600}$  of 0.5 revealed no morphological defect of the *ΔelyC* cells at 37°C (Figure 1C), unlike at 21°C, where the cells bulge and eventually lyse. Furthermore, microscopic images taken at more advanced  $OD_{600}$  showed that the *ΔelyC* cells continued to growth normally at 37°C (Data not shown). Image analysis of the cells taken at  $OD_{600}$  of 0.5 revealed a significant enlargement of the *ΔelyC* cells at 37°C compared to those of the wild-type at the same temperature (Fig. 1D). This specific phenotype of the *ΔelyC* cells growing at 37°C suggest a defect at le level of the peptidoglycan.

## The peptidoglycan analysis of the $\Delta elyC$ mutant strain reveals a defect in PG content at 37°C.

One of the possible reasons that could explain the morphological change in  $\Delta elyC$  cells growing at 37°C is changes in the structure or the thickness of peptidoglycan layer which affect its fitness and makes it less resistant to the internal cell pressure and thus, provoke cell widening. To test this hypothesis, we did an Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) (18) analysis of the peptidoglycan composition of the  $\Delta elyC$  cells growing either at 21°C and 37°C. Wild-type strain was used as a control for normal PG. The peptidoglycan from three biological replicates of the wild-type and  $\Delta elyC$  strains growing until an OD<sub>600</sub> of 0.5 at 21°C and 37°C was isolated. The PG pellets were digested with muramidase and the resulting muropeptides were analyzed by UPLC (18) followed by a statistical analysis of the data. The total PG amount was calculated from the total intensity of the peaks detected in the UPLC analysis. The relative amounts of PG were determined by using the wild-type strain at 37°C as the reference. As shown in Fig. 2A, the  $\Delta elyC$  mutant produced significantly much less PG at 21°C as compared to the wild-type strain. Indeed, the absence of ElyC resulted in a reduction of approximatively 55% in the PG content at 21°C. Interestingly, the amount of PG was also significantly reduced in the  $\Delta elyC$  mutant grown at 37°C (38%). However, the quantity of PG in the  $\Delta elyC$  mutant is more affected at 21°C than at 37°C.

The muropeptides produced by the muramidase digestion of PG were separated and analyzed by UPLC. The chromatographic profiles were almost identical in all the samples (Fig. 2B). The statistical analysis showed no significative difference in muropeptides and their relative abundance between the  $\Delta elyC$  and the wild-type cells. Furthermore, the percentage of cross-link in each sample was almost the same (approximately 30%) and similar abundance was shown for the muropeptide fraction terminating with 1,6-anhydro, which indicated that the average of the glycan strand length is also similar between the WT and the  $\Delta elyC$  mutant cells and that at the both temperatures (Fig. 2C and Table S2). The level of interaction between the OM and the PG compartments is similar, indicating that the abundance of muropeptides with OM Braun's Lipoprotein (Lpp) moiety is the same in all the samples. Overall, these results revealed that the absence of ElyC affects the PG amount but does not induce any structural modification strongly supporting the hypothesis that the decrease in PG amount could be the consequence of the cell enlargement at 37°C.

### **The $\Delta elyC$ mutant is sensitive to $\beta$ -lactam antibiotics at 37°C.**

We reasoned that if the  $\Delta elyC$  mutant has a reduced amount of PG at 37°C, it should be more sensitive to  $\beta$ -lactam antibiotics, which specifically target the peptidoglycan biosynthesis process. We thus tested the sensitivity of the  $\Delta elyC$  mutant at 37°C to a series of  $\beta$ -lactam antibiotics by measuring the Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) toward ampicillin, penicillin G, cephalexin and cefsulodin. Chloramphenicol, which inhibits protein synthesis, was used as a control. For comparison, the Penicillin-Binding Protein 1b (PBP1b) defective mutant ( $\Delta mrcB$ ) was used as a known  $\beta$ -lactams sensitive strain (19). Figure 3A shows that the  $\Delta elyC$  mutant was two times more sensitive to ampicillin and penicillin G than the wild-type strain, and as sensitive to these antibiotics as the  $\Delta mrcB$  mutant. Regarding cephalexin, the  $\Delta mrcB$  mutant was more sensitive (more than 2-fold) than the  $\Delta elyC$  mutant which, itself, was almost two times more sensitive than the wild-type strain. The  $\Delta elyC$  mutant was only slightly more sensitive to cefsulodin than the wild-type strain but much more resistant than the  $\Delta mrcB$  mutant. As expected, the MIC for chloramphenicol, a protein synthesis inhibitor, was identical for the three strains. The sensitivity of both  $\Delta mrcB$  and  $\Delta elyC$  mutants to ampicillin and cephalexin is further illustrated by the appearance of cell lysis following the addition of these antibiotics to log phase cultures (Fig. 3b and c). The sensitivity of  $\Delta elyC$  cells to several  $\beta$ -lactam antibiotics further support the fact that the  $\Delta elyC$  mutant has a PG defect at 37°C.

### **RNAseq analysis of the $\Delta elyC$ mutant reveals a higher transcriptional response at lower temperature.**

The results showing defect in PG amount and sensitivity to  $\beta$ -lactams antibiotics for the  $\Delta elyC$  mutant at 37°C indicated that ElyC has also an effect at this temperature. We aimed to analyze the transcriptomic changes induced by the absence of ElyC at the both temperature. RNAseq libraries were constructed for three biological replicates of the wild-type strain as a control and the  $\Delta elyC$  mutant. These twelve samples were used for sequencing on an Illumina HiSeq platform, with coverage ranging from 18 to 26 million reads for each sample (Table S3). The hierarchical clustering of the samples (Fig. 4A) shows a clear separation of the samples according to the temperature condition. Furthermore, the  $\Delta elyC$  mutant samples and the wild-type strain samples were also clearly separated at 21°C. However, at 37°C, the difference

between  $\Delta elyC$  mutant and wild-type strain samples was less pronounced, likely because the defects of the  $\Delta elyC$  mutant are less severe at this temperature. Genes were determined to be differentially expressed with a significant Benjamini-Hochberg adjusted p-values (p-adj)  $< 0.05$ . The number of differentially expressed genes between the wild-type strain and the  $\Delta elyC$  mutant were also more important at 21°C than at 37°C. Indeed, we identified 147 genes at 21°C and 51 genes at 37°C. Among these genes, 94 and 32 genes were upregulated at 21°C and 37°C, respectively (Fig. 4B). 53 genes at 21°C and 19 genes at 37°C were found to be downregulated (Fig. 4B). The differentially expressed genes were examined for their known cellular functions, regulatory expression mechanisms and biological processes. Based on these informations the genes were then classified into over-representative functional groups. The results of the grouping analysis are summarized in Fig. 5 and Table 1-4.

### **The ElyC defect at 21°C induces a transcriptional activation of several genes associated with envelope stress.**

In the set of upregulated genes at 21°C, most of them belong to the functional group of envelope stress response genes (Fig. 5A, Table 1). This group of genes is essentially involved in biofilm and extracellular polysaccharide formation, osmotic stress response, PG protection, cardiolipin phospholipid biogenesis, oxidative stress and periplasmic protein folding. At least five periplasmic stress response systems contributed to these changes. Indeed, among the upregulated genes identified in this study, several are known to be specifically induced by the following systems: Rcs, Cpx, EnvZ/OmpR, and the sigma factors *rpoS* ( $\sigma^S$ ), *rpoE* ( $\sigma^E$ ). Some of the identified genes related to the activation of the Rcs system are the transcriptional regulator *rcsA*, the osmotic stress protein OmsB, the colanic acid biosynthesis genes (i. e. *wza*, *wzc*, *wzb*, *wcaA*, *wcaG*) (20, 21), and the periplasmic protein Ivy which protects the peptidoglycan from lysozyme's degradation (22). Among genes related to the activation of Cpx two-component system are the periplasmic protein folding catalysts DegP, PpiD and Spy (23, 24). The activation of the general stress response factor  $\sigma^S$  is reported to upregulate the expression of genes such as *otsA*, *otsB* and *osmE*, which are identified in this study (25, 26). Finally, the transcriptional activation of a small RNA *omrA*, *omrB* (27, 28), and the periplasmic protein folding catalyst *fkpA* (29, 30) are known to be related to the EnvZ/OmpR two-component system and the envelope stress response factor  $\sigma^E$ , respectively.

Another highly represented group of upregulated genes are those of unknown function. A transcriptional upregulation of *yggE* and *ydeI*, encoding for predicted envelope proteins involved in oxidative stress defense, was also observed. The transcription of *yggE* is known to be upregulated by the general  $\sigma^S$  stress response factor (26) and *ydeI* was shown in a previous study to be upregulated following the envelope stress response (31). Upregulated genes related to peptidoglycan are not overrepresented, but include the peptidoglycan biosynthesis gene *mure* (32), hydrolysis genes *mepM* and *pbpG* (33, 34) and the two-envelope stress induced genes *ivy* and *mliC* that protect peptidoglycan from lysozyme degradation (22, 35).

Therefore, the transcriptomic analysis of the upregulated genes in the  $\Delta elyC$  mutant at 21°C suggests the presence of a highly defective cellular envelope, which is illustrated by the activation of several envelope stress response systems and their related genes. This response confirms that the alteration of the  $\Delta elyC$  mutant at 21°C is mostly related to defects in the envelope compartment that could be due to, at least, PG damage.

#### **The activation of the envelope stress response at 37°C is moderate compared to 21°C.**

The level of upregulated genes that belong to the group of envelope stress response is considerably lower in the absence of ElyC at 37°C (6%) as compared to 21°C (40%) (Fig. 5A, Table 2). The genes in this group are essentially those encoding the periplasmic proteases and chaperones DegP and BepA, a high conductance mechanosensitive channel protein MscL and the osmotic stress-induced protein HdhA. The periplasmic proteases/chaperones DegP and BepA are known to be specifically induced by the Cpx envelope stress response system (23, 24) and the RpoE system (36), respectively. MscL and HdhA belong to RpoS and RpoE regulon (37, 38), respectively, and are induced in response to osmotic stresses. In the group of genes with unknown functions at 37°C, both *ymgD* and *yngG* were found to be also upregulated at 21°C (Fig. 5C). Several upregulated genes at 37°C are those associated with primary metabolism as well as some transcriptional regulators controlling various metabolic processes. As upregulated genes, we also identified some genes involved in cellular transport and cell division. Thus, the analysis of the upregulated genes at 37°C suggested that, unlike cells grown at 21°C, the envelope stress response was only slightly activated at 37°C.

**Several cellular functions taking place in the envelope compartment are downregulated in the  $\Delta elyC$  mutant at 21°C.**

Almost all the downregulated genes in the  $\Delta elyC$  cell at 21°C are involved in specific cellular envelope functions (Fig. 5B, Table 3). Indeed, we found several genes involved in cellular transport systems including amino acid and sugar transport, mechanosensing channels, and multidrug efflux systems. Several of these transporters require energy derived from proton motive force or ATP hydrolysis for their activity, which is mainly produced from electron transport during the respiratory process (39, 40). Interestingly, important components of the aerobic respiratory chain such as the *cyoC* and *cyoB* genes respectively coding for cytochrome C and subunit I of the cytochrome *bo* terminal oxidase complex, and the electron feeding respiratory chain protein Gcd are downregulated. Furthermore, other groups of downregulated genes are involved in high energy consuming processes, including the cell mobility and the protein-export machineries. Indeed, several flagella biosynthesis genes, including the main regulators of flagellum genes expression *flhDC*, as well as some important constituents of the protein export machinery system such as the ATPase SecA, the two-accessory proteins SecD, SecF and the insertase YidC are downregulated. We also found genes involved in the outer membrane biogenesis such as, *mlaF*, *mlaE*, *mlaD*, *mlaC*, which are components of the ABC transporter involved in the maintenance of outer membrane asymmetry. The lipid A modification genes *arnC* and *eptA*, and their signal activator two-component system BasSR (41) were also found to be downregulated. The functional grouping of the downregulated genes in the  $\Delta elyC$  mutant at 21°C revealed that most of these genes are involved in key cellular processes taking place in the envelope compartments, mainly in the IM processes that produce (respiratory chain) or require (transporters, motility or protein export) energy.

**Functional groups of genes related to envelope located mechanisms are also downregulated at 37°C.**

The functional groups of downregulated genes in the  $\Delta elyC$  mutant at 37°C, are similar to those identified at 21°C (Fig 5B, Table 4). The most important is the one involved in cell mobility, mainly flagella apparatus genes. The flagellum-specific ATP synthase FliI and the flagella motor switch protein FliG were found to be downregulated at 21°C and 37°C (Fig 5C). In the group of membrane transporters, the downregulated genes are those mostly involved in ions

exchange between the cytoplasmic and the periplasmic compartments, such as potassium translocating ATPase subunit KdpB, the sodium/proton antiporter NhaB, and the high permeability porin OmpF. Another group of downregulated genes found at both temperatures conditions was the one composed of genes coding components of the respiratory process. At 37°C the NADH dehydrogenases subunits NuoM/N showed a decrease in the transcriptional level of their mRNA. These two proteins are involved in proton translocation during the respiratory process, which in turn results in PMF production (42, 43). In the group of protein export machinery, we identified the membrane protein insertion efficacy factor YidD and the lipoprotein maturation factor Lnt. The outer membrane biogenesis gene *mlaF* is downregulated both at 21°C and 37°C (Fig 5C). This gene codes for the ATP biding subunit of the Mla phospholipid ABC transporter complex involved in the maintenance of the outer membrane asymmetry. The analysis of the downregulated genes in the  $\Delta elyC$  mutant suggest that similar cellular functions are affected at 21 and 37°C.

## Discussion

ElyC was previously identified as novel factor important for PG biogenesis at low temperature. The  $\Delta elyC$  mutant cells present a PG assembly arrest after approximatively 5.5 hours of growth at low temperature and begin to lyse one doubling time following the initial manifestation of the PG defect. The  $\Delta elyC$  mutant does not show a growth defect at 37°C and the PG assembly was not analyzed at this temperature (10). The biological function of the ElyC factor is still unknown, and the fact that ElyC is important for cell viability at low temperature but not at 37°C is not understood. In our study, we aimed to investigate the phenotype of the  $\Delta elyC$  mutant cells growing at 37°C and analyse the transcriptomic cell response to the ElyC defect at low temperature (21°C) and 37°C, to better understand the effect of the temperature on the behavior of the  $\Delta elyC$  mutant.

Although  $\Delta elyC$  cells did not lyse at 37°C, they were significantly wider than the wild-type cells. However, the peptidoglycan quantitative analysis clearly revealed a defect in PG synthesis at 37°C. Compared to the wild-type strain, the  $\Delta elyC$  mutant strain had around 38% less PG at 37°C and less than 55% at 21°C. Furthermore, we showed that as compared to the WT strain, the  $\Delta elyC$  mutant at 37°C is more sensitive to  $\beta$ -lactam antibiotics, which target the later stage of the peptidoglycan assembly pathway. Altogether, these results suggest that ElyC has an important effect in PG biogenesis at 37°C. The fact that the PG synthesis defect is more pronounced at 21°C than at 37°C can explain why the bacteria lyse at 21°C but not at 37°C. Indeed, it is known that cells with reduced amount of PG, less than 50%, have no alteration in their morphology and growth (44). Thus, the  $\Delta elyC$  mutant at 37°C has enough PG to maintain proper cell morphology and a normal growth. At 21°C the reduction in the amount of PG of about 50% (55 %) induces cell lysis. However, the significant widening of the  $\Delta elyC$  mutant cells at 37°C could be one of the consequences of the lack of PG at this temperature. Indeed, the decrease in the PG amount at 37°C may reduce cell rigidity and thickness; this, combined with the force exerted on the inner membrane by the turgor pressure could widen the  $\Delta elyC$  mutant cells. The morphological change could also be the result of PG structural modifications. However, the analysis of the PG composition in the  $\Delta elyC$  mutant at 37°C did not show any structural modifications that could explain the morphological change at this temperature.

The UPLC analysis of the PG did not show any difference in either the composition or the structure of peptidoglycan extracted from the  $\Delta elyC$  mutant compared to the wild-type at both temperature conditions. This suggest that the decrease in PG amount is probably not a consequence of an aberrant activation of PG hydrolysis or other modifying enzymes. Rather, it is likely the result of a blockage in the PG biosynthesis pathway. The results of a previous studies suggested that PG biosynthesis is blocked at the level of the inner membrane, specifically at the step involving the undecaprenyl phosphate lipid II carrier (10). In this study, the results of the RNAseq analysis showed a transcriptomic downregulation of several processes taking place at the level of the inner membrane, suggesting that this cellular compartment is probably affected by the absence of the ElyC factor. If this interpretation is correct, the flow through of PG synthesis could be decreased or totally inhibited.

RNAseq experiments showed that the ElyC defect at 21°C led to higher number of differentially expressed genes than at 37°C. Thus, a relationship between the strength of the  $\Delta elyC$  phenotypes and the magnitude of the transcriptional response was observed.

Our results show that among the upregulated genes at 21°C, those involved in envelope stress responses and with unknown functions are over-represented. A comparison of these unknown function genes to those previously reported to be upregulated after treating the cells with inhibitors of lipoprotein transport or antibiotic targeting peptidoglycan biosynthesis, showed a great overlap (20, 31), which suggests that many of these genes are related to the envelope stress response. The envelope stress response in the  $\Delta elyC$  mutant at 21°C is monitored by the activation of several envelope stress response systems such as the Rcs system, Cpx and the EnvZ/OmpR two-component system and the sigma factors, RpoE and RpoS. The overexpression of the periplasmic chaperone Spy, known to be induced by both Cpx and Bae envelope stress systems, suggests a possible induction of the Bae system (45). These transduction signals contribute to the upregulation of a series of genes involved in envelope stress responses such as osmotic stress response, biofilm and extracellular polysaccharide formation, periplasmic protein folding, oxidative stress, and some peptidoglycan homeostasis related genes.

The envelope stress response in the  $\Delta elyC$  mutant at 37°C was moderate compared to the one at 21°C. We noted the activation of some genes related to Cpx, RpoS and RpoE regulon but no other detectable envelope stress response systems were shown to be activated in our RNAseq experiments. Some of the envelope stress response related genes are the chaperone/proteases DegP et BepA, the osmotic stress protein HdhA and the proteins of unknown function, YmgG and YmgD. These two proteins were reported to be induced in the presence of an envelope defect (20, 31). Their synthesis is also induced in the  $\Delta elyC$  mutant at 21°C. The level of activation of the envelope stress response also correlate with the level of peptidoglycan defect in the  $\Delta elyC$  mutant.

The analysis of the downregulated genes in the  $\Delta elyC$  mutant at 21°C revealed enrichment in genes involved in mechanisms taking place in the envelope, mainly in the inner membrane. Among these genes are those involved in the electron transport chain energy consuming transport, flagella mobility and protein export machinery. The downregulation of *cyoB* and *cyoC* encoding for subunits of the cytochrome *bo* terminal oxidase of the respiratory chain, would be expected to decrease the respiratory process, thereby, perhaps affecting the ATP production and PMF. The transcriptional reduction of the level of genes involved in the respiratory chain is also observed at 37°C. Indeed, the two genes *nuoM* and *nuoN* coding for subunits of the NADH dehydrogenase are significantly downregulated. These transcriptional changes at both temperatures could be the consequence of the activation of the Cpx two-component system. Indeed, the Cpx response in *E. coli* was previously shown to lead to decrease in the expression level of genes coding different components of the respiratory chain, among them the cytochrome *bo* oxidase (downregulated in the  $\Delta elyC$  mutant at 21°C) and NADH dehydrogenase (downregulated in the  $\Delta elyC$  mutant at 37°C) (24, 46). The downregulation of genes involved in cellular transport in the  $\Delta elyC$  mutant, could also be a consequence of the activation of the Cpx system (24, 46).

Genes for key compounds of the protein export machinery are downregulated in the  $\Delta elyC$  mutant at 21°C (SecA, SecF, SecD and YidC). Interestingly, it has been shown in previous studies that mutations decreasing the amount of Sec factors (Sec D, F), are cold-sensitive (Cs) (48). Morevoer, *E. coli* mutants carrying individual *sec* gene deletions or mutations are unable

to grow at low temperatures, but grow normally at 37°C (48-50). At low temperature, the composition of the inner membrane phospholipids is modified, which makes protein export machinery less effective and therefore more sensitive to mutations at this level. This leads to the accumulation of abnormal envelope proteins and the activation of the Cpx and RpoE extracytoplasmic stress systems (51). In the  $\Delta elyC$  mutant, the decrease in the transcriptional level of *secA*, *secF*, *secD* and *yidC* may contribute to the  $\Delta elyC$  cold sensitive phenotype and the activation of the Cpx and the RpoE. It will be interesting to investigate this hypothesis in future studies.

In this study, we showed for the first time that the ElyC factor is important for PG biosynthesis at 37°C. The absence of ElyC decrease the rate of PG biosynthesis at both temperatures but the decrease is more important at low temperature, possibly because of the changes in the composition of the inner membrane phospholipids that occur at low temperature which, in the absence of ElyC, might slow down the flow through of PG synthesis or decrease the efficiency of protein export machinery, which might affect the export of some PG biosynthesis factors. Thus, ElyC might be important for the cell to ensure an optimum PG production rate at high and low temperature.

## **Acknowledgements**

We would like to thank Dr. Marc Drolet, Dr. Elitza Tocheva and Rim Marrakchi for critical reading of the manuscript and Irene Asensio Gudina in assisting in obtaining microscopic images and the CMI for  $\beta$ -lactams antibiotics.

## References

1. Kamio Y, Nikaido H. 1976. Outer membrane of *Salmonella typhimurium*: accessibility of phospholipid head groups to phospholipase c and cyanogen bromide activated dextran in the external medium. *Biochemistry* 15:2561-70.
2. Bos MP, Robert V, Tommassen J. 2007. Biogenesis of the gram-negative bacterial outer membrane. *Annu Rev Microbiol* 61:191-214.
3. Dufresne K, Paradis-Bleau C. 2015. Biology and Assembly of the Bacterial Envelope. *Adv Exp Med Biol* 883:41-76.
4. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. 2010. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a000414.
5. Braun M, Silhavy TJ. 2002. Imp/OstA is required for cell envelope biogenesis in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 45:1289-302.
6. Schleifer KH, Kandler O. 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev* 36:407-77.
7. Vollmer W, Bertsche U. 2008. Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1778:1714-34.
8. Meeske AJ, Sham LT, Kimsey H, Koo BM, Gross CA, Bernhardt TG, Rudner DZ. 2015. MurJ and a novel lipid II flippase are required for cell wall biogenesis in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:6437-42.
9. Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA, Charlier P. 2008. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 32:234-58.
10. Paradis-Bleau C, Kritikos G, Orlova K, Typas A, Bernhardt TG. 2014. A genome-wide screen for bacterial envelope biogenesis mutants identifies a novel factor involved in cell wall precursor metabolism. *PLoS Genet* 10:e1004056.

11. Punta M, Coggill PC, Eberhardt RY, Mistry J, Tate J, Boursnell C, Pang N, Forslund K, Ceric G, Clements J, Heger A, Holm L, Sonnhammer EL, Eddy SR, Bateman A, Finn RD. 2012. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 40:D290-301.
12. Guyer MS, Reed RR, Steitz JA, Low KB. 1981. Identification of a sex-factor-affinity site in *E. coli* as gamma delta. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 45 Pt 1:135-40.
13. Glauner B. 1988. Separation and quantification of muropeptides with high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 172:451-64.
14. Lohse M, Bolger AM, Nagel A, Fernie AR, Lunn JE, Stitt M, Usadel B. 2012. RobiNA: a user-friendly, integrated software solution for RNA-Seq-based transcriptomics. *Nucleic Acids Res* 40:W622-7.
15. Langmead B, Salzberg SL. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9:357-9.
16. Liao Y, Smyth GK, Shi W. 2014. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30:923-30.
17. Anders S, Huber W. 2010. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* 11:R106.
18. Alvarez L, Hernandez SB, de Pedro MA, Cava F. 2016. Ultra-sensitive, high-resolution liquid chromatography methods for the high-throughput quantitative analysis of bacterial cell wall chemistry and structure. *Methods Mol Biol* 1440:11-27.
19. Gutmann L, Vincent S, Billot-Klein D, Acar JF, Mrena E, Williamson R. 1986. Involvement of penicillin-binding protein 2 with other penicillin-binding proteins in lysis of *Escherichia coli* by some beta-lactam antibiotics alone and in synergistic lytic effect of amdinocillin (mecillinam). *Antimicrob Agents Chemother* 30:906-12.
20. Laubacher ME, Ades SE. 2008. The Rcs phosphorelay is a cell envelope stress response activated by peptidoglycan stress and contributes to intrinsic antibiotic resistance. *J Bacteriol* 190:2065-74.

21. Navasa N, Rodriguez-Aparicio L, Ferrero MA, Monteagudo-Mera A, Martinez-Blanco H. 2013. Polysialic and colanic acids metabolism in *Escherichia coli* K92 is regulated by RcsA and RcsB. *Biosci Rep* 33.
22. Deckers D, Vanlint D, Callewaert L, Aertsen A, Michiels CW. 2008. Role of the lysozyme inhibitor Ivy in growth or survival of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* bacteria in hen egg white and in human saliva and breast milk. *Appl Environ Microbiol* 74:4434-9.
23. Raivio TL. 2014. Everything old is new again: an update on current research on the Cpx envelope stress response. *Biochim Biophys Acta* 1843:1529-41.
24. Raivio TL, Leblanc SK, Price NL. 2013. The *Escherichia coli* Cpx envelope stress response regulates genes of diverse function that impact antibiotic resistance and membrane integrity. *J Bacteriol* 195:2755-67.
25. Giaever HM, Styrvold OB, Kaasen I, Strom AR. 1988. Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 170:2841-9.
26. Peano C, Wolf J, Demol J, Rossi E, Petiti L, De Bellis G, Geiselmann J, Egli T, Lacour S, Landini P. 2015. Characterization of the *Escherichia coli* sigma(S) core regulon by Chromatin Immunoprecipitation-sequencing (ChIP-seq) analysis. *Sci Rep* 5:10469.
27. Brosse A, Korobeinikova A, Gottesman S, Guillier M. 2016. Unexpected properties of sRNA promoters allow feedback control via regulation of a two-component system. *Nucleic Acids Res* 44:9650-9666.
28. Guillier M, Gottesman S. 2006. Remodelling of the *Escherichia coli* outer membrane by two small regulatory RNAs. *Mol Microbiol* 59:231-47.
29. Dartigalongue C, Missiakas D, Raina S. 2001. Characterization of the *Escherichia coli* sigma E regulon. *J Biol Chem* 276:20866-75.

30. Danese PN, Silhavy TJ. 1997. The sigma(E) and the Cpx signal transduction systems control the synthesis of periplasmic protein-folding enzymes in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 11:1183-93.
31. Lorenz C, Dougherty TJ, Lory S. 2016. Transcriptional responses of *Escherichia coli* to a small-molecule inhibitor of LolCDE, an essential component of the lipoprotein transport pathway. *J Bacteriol* 198:3162-3175.
32. Michaud C, Mengin-Lecreux D, van Heijenoort J, Blanot D. 1990. Over-production, purification and properties of the uridine-diphosphate-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate: meso-2,6-diaminopimelate ligase from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 194:853-61.
33. Romeis T, Holtje JV. 1994. Penicillin-binding protein 7/8 of *Escherichia coli* is a DD-endopeptidase. *Eur J Biochem* 224:597-604.
34. Singh SK, SaiSree L, Amrutha RN, Reddy M. 2012. Three redundant murein endopeptidases catalyse an essential cleavage step in peptidoglycan synthesis of *Escherichia coli* K12. *Mol Microbiol* 86:1036-51.
35. Callewaert L, Aertsen A, Deckers D, Vanoirbeek KG, Vanderkelen L, Van Herreweghe JM, Masschalck B, Nakimbugwe D, Robben J, Michiels CW. 2008. A new family of lysozyme inhibitors contributing to lysozyme tolerance in gram-negative bacteria. *PLoS Pathog* 4:e1000019.
36. Rhodius VA, Suh WC, Nonaka G, West J, Gross CA. 2006. Conserved and variable functions of the sigmaE stress response in related genomes. *PLoS Biol* 4:e2.
37. Stokes NR, Murray HD, Subramaniam C, Gourse RL, Louis P, Bartlett W, Miller S, Booth IR. 2003. A role for mechanosensitive channels in survival of stationary phase: regulation of channel expression by RpoS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15959-64.
38. Weber H, Polen T, Heuveling J, Wendisch VF, Hengge R. 2005. Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: sigmaS-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *J Bacteriol* 187:1591-603.

39. Haddock BA, Jones CW. 1977. Bacterial respiration. *Bacteriol Rev* 41:47-99.
40. Jormakka M, Byrne B, Iwata S. 2003. Protonmotive force generation by a redox loop mechanism. *FEBS Lett* 545:25-30.
41. Shimada T, Katayama Y, Kawakita S, Ogasawara H, Nakano M, Yamamoto K, Ishihama A. 2012. A novel regulator RcdA of the csgD gene encoding the master regulator of biofilm formation in *Escherichia coli*. *Microbiologyopen* 1:381-94.
42. Friedrich T. 1998. The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1364:134-46.
43. Steimle S, Bajzath C, Dorner K, Schulte M, Bothe V, Friedrich T. 2011. Role of subunit NuoL for proton translocation by respiratory complex I. *Biochemistry* 50:3386-93.
44. Prats R, de Pedro MA. 1989. Normal growth and division of *Escherichia coli* with a reduced amount of murein. *J Bacteriol* 171:3740-5.
45. Srivastava SK, Lambadi PR, Ghosh T, Pathania R, Navani NK. 2014. Genetic regulation of spy gene expression in *Escherichia coli* in the presence of protein unfolding agent ethanol. *Gene* 548:142-8.
46. Bury-Mone S, Nomane Y, Reymond N, Barbet R, Jacquet E, Imbeaud S, Jacq A, Bouloc P. 2009. Global analysis of extracytoplasmic stress signaling in *Escherichia coli*. *PLoS Genet* 5:e1000651.
47. Francez-Charlot A, Laugel B, Van Gemert A, Dubarry N, Wiorowski F, Castanie-Cornet MP, Gutierrez C, Cam K. 2003. RcsCDB His-Asp phosphorelay system negatively regulates the flhDC operon in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 49:823-32.
48. Nouwen N, Driessen AJ. 2005. Inactivation of protein translocation by cold-sensitive mutations in the yajC-secDF operon. *J Bacteriol* 187:6852-5.
49. Gardel C, Benson S, Hunt J, Michaelis S, Beckwith J. 1987. secD, a new gene involved in protein export in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 169:1286-90.

50. Pogliano KJ, Beckwith J. 1993. The Cs sec mutants of *Escherichia coli* reflect the cold sensitivity of protein export itself. *Genetics* 133:763-73.
51. Shimohata N, Nagamori S, Akiyama Y, Kaback HR, Ito K. 2007. SecY alterations that impair membrane protein folding and generate a membrane stress. *J Cell Biol* 176:307-17.
52. Yu Z, Laven M, Klepsch M, de Gier JW, Bitter W, van Ulsen P, Luirink J. 2011. Role for *Escherichia coli* YidD in membrane protein insertion. *J Bacteriol* 193:5242-51.

## Tables and Figures

**Table 1.** Upregulated genes in the  $\Delta elyC$  mutant cells at 21°C.

Groups	Gene_name	FoldChange	Product
	<i>osmB</i>	10.41	Lipoprotein
	<i>wza</i>	6.04	Colanic acid export protein; outer membrane auxillary lipoprotein
	<i>wzb</i>	5.69	Colanic acid production protein-tyrosine-phosphatase; Wzc-P dephosphorylase
	<i>yjbF</i>	4.75	Extracellular polysaccharide production lipoprotein
	<i>wcaA</i>	4.51	Putative glycosyl transferase
	<i>yjbG</i>	4.23	Extracellular polysaccharide export OMA protein
Envelope stress response	<i>wcaG</i>	4.06	Bifunctional GDP-fucose synthetase
	<i>wzc</i>	4.04	Colanic acid production tyrosine-protein kinase; autokinase; Ugd phosphorylase
	<i>gmd</i>	3.92	GDP-D-mannose dehydratase, NAD(P)-binding
	<i>wcaB</i>	3.62	Putative acyl transferase
	<i>ivy</i>	3.60	Inhibitor of c-type lysozyme, periplasmic
	<i>wcaD</i>	3.18	Putative colanic acid polymerase
	<i>wcaF</i>	2.90	Putative acyl transferase
	<i>wcaI</i>	2.86	Putative glycosyl transferase

---

<i>wcaC</i>	2.86	Putative glycosyl transferase
<i>yjbE</i>	2.82	Extracellular polysaccharide production threonine-rich protein
<i>cpsB</i>	2.25	Mannose-1-phosphate guanyltransferase
<i>cpsG</i>	2.22	Phosphomannomutase
<i>otsB</i>	2.03	Trehalose-6-phosphate phosphatase, biosynthetic
<i>spy</i>	2.01	Periplasmic ATP-independent protein refolding chaperone, stress-induced
<i>osmY</i>	1.92	Periplasmic protein
<i>otsA</i>	1.89	Trehalose-6-phosphate synthase
<i>mliC</i>	1.71	Inhibitor of c-type lysozyme, membrane-bound; putative lipoprotein
<i>yjbH</i>	1.65	DUF940 family extracellular polysaccharide protein
<i>loiP</i>	1.59	Phe-Phe periplasmic metalloprotease, OM lipoprotein
<i>clsB</i>	1.51	Cardiolipin synthase 2
<i>degP</i>	1.42	Serine endoprotease (protease Do), membrane-associated
<i>ygaM</i>	1.30	DUF883 family protein, putative membrane-anchored ribosome-binding protein
<i>osmE</i>	1.28	Osmotically-inducible lipoprotein

---

---

	<i>ppiA</i>	1.25	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (rotamase A)
	<i>ybiO</i>	1.23	Mechanosensitive channel protein, intermediate conductance
	<i>galU</i>	1.22	Glucose-1-phosphate uridylyltransferase
	<i>pbpG</i>	1.21	D-alanyl-D-alanine endopeptidase
	<i>ompC</i>	1.20	Outer membrane porin protein C
	<i>srkA</i>	1.18	Stress response kinase A; MazF antagonist
	<i>mepM</i>	1.17	Murein DD-endopeptidase, space-maker hydrolase, septation protein
	<i>murE</i>	1.17	UDP-N-acetyl muramoyl-L-alanyl-D-glutamate:meso-diaminopimelate ligase
	<i>opgD</i>	1.15	Osmoregulated periplasmic glucan (OPG) biosynthesis periplasmic protein
	<i>fkpA</i>	1.13	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (rotamase)
<hr/>			
	<i>ymgG</i>	14.95	UPF0757 family protein
	<i>ymgD</i>	11.31	uncharacterized protein
	<i>ygaC</i>	3.95	Uncharacterized protein
Unknown function	<i>ypeC</i>	3.17	DUF2502 family putative periplasmic protein
	<i>ygdI</i>	2.50	DUF903 family verified lipoprotein
	<i>yghA</i>	2.40	Putative oxidoreductase

<i>yjdP</i>	2.10	Putative periplasmic protein
<i>ytjA</i>	2.08	Uncharacterized protein
<i>yaiY</i>	2.04	DUF2755 family inner membrane protein
<i>ybdR</i>	1.97	Putative Zn-dependent NAD(P)-binding oxidoreductase
<i>rcnB</i>	1.90	Predicted periplasmic modulator of Ni and Co efflux
<i>yajI</i>	1.87	Putative lipoprotein
<i>yjjZ</i>	1.84	Putative protein
<i>ybgS</i>	1.82	Putative periplasmic protein
<i>ypfG</i>	1.69	DUF1176 family protein
<i>ybhP</i>	1.57	Endo/exonuclease/phosphatase family protein
<i>hslJ</i>	1.56	Heat-inducible lipoprotein involved in novobiocin resistance
<i>yiaD</i>	1.56	Multicopy suppressor of bamB; outer membrane lipoprotein
<i>ygiM</i>	1.47	SH3 domain protein
<i>ygdR</i>	1.45	DUF903 family verified lipoprotein
<i>yfdC</i>	1.42	Inner membrane protein YfdC
<i>rttR</i>	1.41	RttR small RNA
<i>ybjP</i>	1.36	Lipoprotein

	<i>yhjB</i>	1.36	Putative DNA-binding transcriptional response regulator
	<i>yceJ</i>	1.29	Putative cytochrome b561
	<i>yegS</i>	1.27	Phosphatidylglycerol kinase, metal-dependent
	<i>ydcF</i>	1.26	DUF218 superfamily protein, SAM-binding
	<i>ytfK</i>	1.26	DUF1107 family protein
	<i>yceI</i>	1.23	Secreted protein
	<i>yaiW</i>	1.19	Surface exposed outer membrane lipoprotein
	<i>bdm</i>	16.40	Biofilm-dependent modulation protein
	<i>rcsA</i>	3.52	Transcriptional regulator of colanic acid capsular biosynthesis
	<i>omrB</i>	1.88	OmrB small regulatory RNA
	<i>omrA</i>	1.84	OmrA small regulatory RNA
Regulatory elements	<i>soxS</i>	1.82	Superoxide response regulon transcriptional activator; autoregulator
	<i>yrfF(IgaA)</i>	1.71	Inner membrane protein
	<i>treR</i>	1.46	Trehalose 6-phosphate-inducible trehalose regulon transcriptional repressor
	<i>gatR</i>	1.38	Negative DNA-binding transcriptional regulator of galactitol metabolism
	<i>yjbJ</i>	1.29	Stress-induced protein, UPF0337 family

	<i>rseA</i>	1.26	Anti-sigma factor
	<i>mraZ</i>	1.26	RsmH methytransferase inhibitor
	<i>csrD</i>	1.15	Targeting factor for csrBC sRNA degradation
	<i>menI</i>	1.29	1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-CoA thioesterase
	<i>ilvI</i>	1.23	Acetolactate synthase 3 large subunit
Metabolism	<i>alaA</i>	1.19	Valine-pyruvate aminotransferase 2
	<i>glnA</i>	1.19	Glutamine synthetase
	<i>sdaA</i>	1.18	L-serine dehydratase 1
	<i>raiA</i>	1.48	Cold shock protein associated with 30S ribosomal subunit
Protein translation	<i>argQ</i>	1.20	tRNA <sup>argQ</sup>
	<i>rsmH</i>	1.20	16S rRNA m(4)C1402 methyltransferase, SAM-dependent
	<i>cca</i>	1.15	Fused tRNA nucleotidyl transferase/2'3'-cyclic phosphodiesterase
Oxidative stress	<i>ydeI</i>	2.14	Hydrogen peroxide resistance OB fold protein; putative periplasmic protein
	<i>yggE</i>	1.27	Oxidative stress defense protein
Cell division	<i>ftsL</i>	1.18	Membrane bound cell division protein at septum
	<i>ftsI</i>	1.13	Transpeptidase involved in septal peptidoglycan synthesis

**Table 2.** Upregulated genes in the  $\Delta$ elyC mutant cells at 37°C.

Groups	Gene_name	FoldChange	Product
Metabolism	<i>cobS</i>	1.78	Cobalamin synthase
	<i>wbbH</i>	1.45	O-antigen polymerase
	<i>sfsA</i>	1.43	sugar fermentation stimulation protein A
	<i>asnA</i>	1.40	Asparagine synthetase A
	<i>glk</i>	1.40	Glucokinase
	<i>glf</i>	1.40	UDP-galactopyranose mutase, FAD/NAD(P)-binding
	<i>metE</i>	1.28	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine S-methyltransferase
	<i>fabB</i>	1.27	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase I
	<i>hdhA</i>	1.26	7-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase, NAD-dependent
	<i>gstB</i>	1.25	Glutathione S-transferase
	<i>aspC</i>	1.23	Aspartate aminotransferase, PLP-dependent
	<i>pgk</i>	1.14	Phosphoglycerate kinase
	<i>glmS</i>	1.13	L-glutamine:D-fructose-6-phosphate aminotransferase
	<i>tyrS</i>	1.12	Tyrosyl-tRNA synthetase
	<i>ymgG</i>	3.61	UPF0757 family protein

	<i>ymgD</i>	2.76	Uncharacterized protein
	<i>yigF</i>	1.66	Putative inner membrane protein
	<i>yfaZ</i>	1.44	Outer membrane protein, putative porin
Unknown function	<i>ydgH</i>	1.35	DUF1471 family periplasmic protein
	<i>yebK</i>	1.29	putative DNA-binding transcriptional regulator
	<i>ydaN</i>	1.23	Putative Zn(II) transporter
	<i>ybhC</i>	1.20	Acyl-CoA thioesterase, lipoprotein
Membrane transporters	<i>cusC</i>	2.16	Copper/silver efflux system, outer membrane component
	<i>uhpT</i>	1.99	Hexose phosphate transporter
	<i>sbmA</i>	1.22	Microcin B17 transporter
	<i>mscL</i>	1.19	Mechanosensitive channel protein, high conductance
	<i>acrA</i>	1.18	Multidrug efflux system
Regulatory elements	<i>allR</i>	1.16	transcriptional repressor of all and gcl operons; glyoxylate-induced
	<i>uvrY</i>	1.15	response regulator in two-component regulatory system with BarA
Envelope stress response	<i>degP</i>	1.39	Serine endoprotease (protease Do), membrane-associated
	<i>bepA</i>	1.17	Periplasmic metalloprotease and chaperone for OM protein maintenance and assembly

Cell division	<i>ftsA</i>	1.19	ATP-binding cell division protein involved in recruitment of FtsK to Z ring
---------------	-------------	------	---

**Table 3.** Downregulated genes in the *ΔelyC* mutant cells at 21°C.

Groups	Gene_name	Fold Change	Product
Membrane transporters	<i>proW</i>	-1.66	Glycine betaine transporter subunit
	<i>proX</i>	-1.64	Glycine betaine transporter subunit
	<i>proV</i>	-1.62	Glycine betaine transporter subunit
	<i>dtpB</i>	-1.44	Peptide permease
	<i>chbC</i>	-1.32	Chitobiose PTS permease
	<i>iceT(mdtD)</i>	-1.31	Putative arabinose effus system
	<i>mdtC</i>	-1.31	MdtABC-TolC multidrug efflux system
	<i>mscS</i>	-1.27	Mechanosensitive channel protein, small conductance
	<i>nagE</i>	-1.24	N-acetylglucosamine PTS permease
	<i>ptsG</i>	-1.21	Transport and phosphorylation of D-glucose
	<i>ansP</i>	-1.19	L-asparagine transporter
	<i>brnQ</i>	-1.18	Transport leucine, valine, and isoleucine
	<i>mdlB</i>	-1.18	Putative transport protein, ABC superfamily
	<i>pheP</i>	-1.17	Phenylalanine transporter

	<i>proY</i>	-1.16	Proline-specific permease
	<i>gltS</i>	-1.15	Glutamate transporter
	<i>ydaM</i>	-1.58	Diguanylate cyclase, csgD regulator
	<i>fliF</i>	-1.58	Flagellar basal-body MS-ring and collar protein
	<i>fliI</i>	-1.53	Flagellum-specific ATP synthase
	<i>fliG</i>	-1.48	Flagellar motor switching and energizing component
	<i>fliK</i>	-1.47	Flagellar hook-length control protein
	<i>fliH</i>	-1.47	Negative regulator of FliI ATPase activity
Mobility	<i>flhC</i>	-1.44	Flagellar class II regulon transcriptional activator, with FlhD
	<i>flhB</i>	-1.44	Flagellin export apparatus, substrate specificity protein
	<i>flhA</i>	-1.40	Putative flagellar export pore protein
	<i>flhD</i>	-1.40	Flagellar class II regulon transcriptional activator, with FlhC
	<i>flgA</i>	-1.39	Assembly protein for flagellar basal-body periplasmic P ring
	<i>csrC</i>	-1.25	ncRNA
Outer membrane biogenesis	<i>arnC</i>	-1.92	Undecaprenyl phosphate-L-Ara4FN transferase
	<i>eptA</i>	-1.83	Lipid A phosphoethanolamine transferase

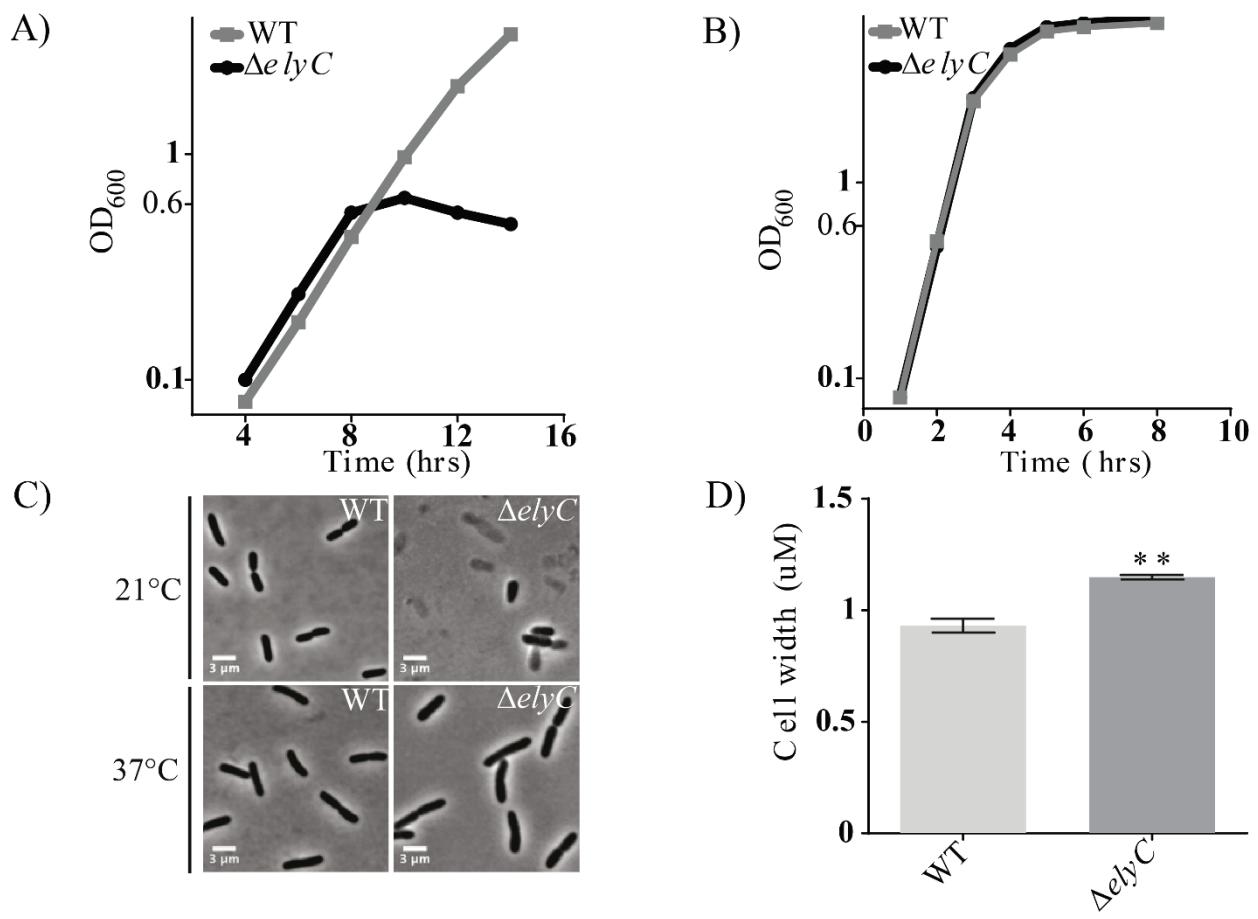
	<i>mlaD</i>	-1.23	ABC transporter maintaining OM lipid asymmetry, anchored periplasmic binding protein
	<i>lpxK</i>	-1.20	Lipid A 4'kinase
	<i>msbA</i>	-1.17	Fused lipid transporter subunits of ABC superfamily: membrane component/ATP-binding component
	<i>mlaC</i>	-1.16	ABC transporter maintaining OM lipid asymmetry, periplasmic binding protein
	<i>mlaE</i>	-1.15	ABC transporter maintaining OM lipid asymmetry, inner membrane permease protein
	<i>mlaF</i>	-1.14	ABC transporter maintaining OM lipid asymmetry, ATP-binding protein
Protein export	<i>secF</i>	-1.15	SecYEG protein translocase auxillary subunit
	<i>yidC</i>	-1.14	Membrane protein insertase
	<i>secD</i>	-1.13	SecYEG protein translocase auxillary subunit
	<i>secA</i>	-1.11	Preprotein translocase subunit, ATPase
Unknown function	<i>ygaY</i>	-1.46	Pseudogene
	<i>yhaM</i>	-1.41	Putative L-serine dehydratase alpha chain
	<i>yhaO</i>	-1.36	Hydroxy/Aromatic Amino Acid Permease (HAAAP) Family (putative permease)
	<i>yagU</i>	-1.25	DUF1440 family inner membrane protein

	<i>yafK</i>	-1.18	L,D-transpeptidase-related protein
Respiratory chain	<i>cyoC</i>	-1.20	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit III
	<i>cyoB</i>	-1.20	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit I
Metabolism	<i>gcd</i>	-1.30	Glucose dehydrogenase
	<i>lacZ</i>	-1.25	Beta-D-galactosidase
Regulatory elements	<i>lysU</i>	-1.25	Lysine tRNA synthetase, inducible
	<i>folC</i>	-1.13	Bifunctional folylpolyglutamate synthase/dihydrofolate synthase
Regulatory	<i>basR</i>	-1.58	Response regulator in two-component regulatory system with BasS
	<i>basS</i>	-1.41	Sensory histidine kinase in two-component regulatory system with BasR

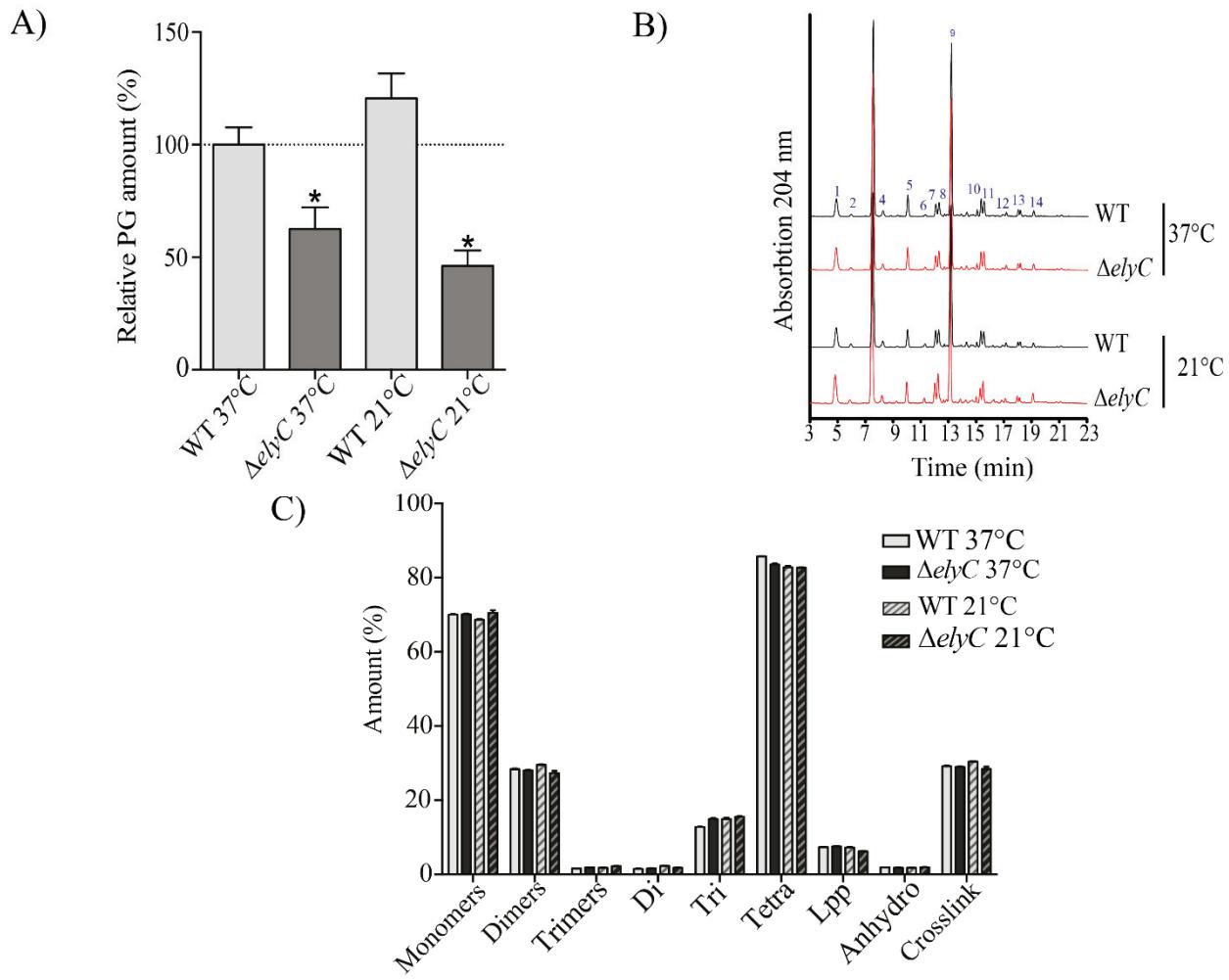
**Table 4.** Downregulated genes in the *ΔelyC* mutant cells at 37°C.

Groups	Gene_name	FoldChange	Product
Mobility	<i>fliP</i>	-1.56	Flagellar biosynthesis protein
	<i>fliI</i>	-1.48	Flagellum-specific ATP synthase
Membrane transporters	<i>fliG</i>	-1.47	Flagellar motor switching and energizing component
	<i>fliL</i>	-1.47	Flagellar biosynthesis protein
Membrane transporters	<i>kdpB</i>	-1.35	Potassium translocating ATPase, subunit B

	<i>ompF</i>	-1.33	Outer membrane porin 1a (Ia;b;F)
	<i>nhaB</i>	-1.14	Sodium:proton antiporter
Regulatory elements	<i>rstB</i>	-1.34	Sensory histidine kinase of RstAB two-component system, low Mg-responsive via PhoQP
	<i>deAD</i>	-1.20	ATP-dependent RNA helicase
	<i>phoQ</i>	-1.18	Sensory histidine kinase in two-component regulatory system with PhoP
Respiratory chain	<i>nuoM</i>	-1.35	NADH:ubiquinone oxidoreductase, membrane subunit M
	<i>nuoN</i>	-1.31	NADH:ubiquinone oxidoreductase, membrane subunit N
	<i>lnt</i>	-1.29	Apolipoprotein N-acyltransferase
Protein export	<i>yidD</i>	-1.16	Membrane protein insertion efficiency factor, inner membrane protein, UPF0161 family
Unknown function	<i>mgtL</i>	-1.31	Predicted regulatory leader peptide for mgtA
	<i>smtA</i>	-1.21	Putative S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase
Outer membrane biogenesis	<i>mlaF</i>	-1.10	ABC transporter maintaining OM lipid asymmetry, ATP-binding protein
Metabolism	<i>ybjG</i>	-1.14	Undecaprenyl pyrophosphate phosphatase
Cell division	<i>mukB</i>	-1.27	Chromosome condensin MukBEF, ATPase and DNA-binding subunit



**Figure 1. The loss of ElyC results in a growth defect at 21°C but not at 37°C.** (A, B) Growth curve in LB medium at 21°C (A) or at 37°C (B). The cultures of WT and  $\Delta elyC$  were grown overnight at 37°C, the pre-cultures were then diluted to an OD<sub>600</sub> of 0.02 in LB medium and grown at 21°C (A) or at 37°C (B) with agitation. Cell growth was monitored by the measurement of the cultures at OD<sub>600</sub>. Time corresponds to hours after the final culture. (C) Microscopic images of the WT and  $\Delta elyC$  growing at 21°C and 37°C. At approximately OD<sub>600</sub> of 0.5, 3 ul of cells from the indicated cultures were imaged on a 0.8% agarose pads by Nikon eclipse E 600 microscope with a 100X phase contrast objective. The white bar represents 3  $\mu$ M. (D) Average of cell width variation of the WT and the  $\Delta elyC$  cell taking OD<sub>600</sub> of 0.5 after growth at 37°C. The measured were done for three independent experiments using the image processing software Fiji. The width average of 100 cells in each replicated were calculated. Statistical analysis for data was done comparatively to WT cells. Mean  $\pm$  SEM. Asterisks indicate significant differences ( $p$ -value < 0.05).



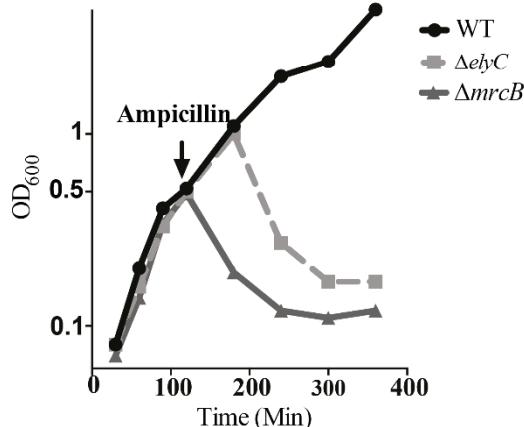
**Figure 2. Peptidoglycan analysis showed a decrease in PG amount in the  $\Delta elyC$  cells at 21°C and 37°C.** PG was purified in triplicate from cells growing to an OD<sub>600</sub> of 0.5 in 500 ml of LB medium at both temperatures. Samples were treated then analysed by UPLC as describe in the Materials and Methods. (A) The relative PG amount of the WT and the  $\Delta elyC$  cells at 21°C and 37°C. The total PG amount were calculated from the total intensity detected in UPLC and the relative amount of PG were then determined by using the wild-type strain at 37°C as the reference. Statistical analysis for data was done comparatively to WT 37°C sample. Mean  $\pm$  SEM. Asterisks indicate significant differences ( $p$ -value  $< 0.05$ ). (B) Chromatographic representation of the muramidase-digested PG samples of the WT and the  $\Delta elyC$  strains at 21°C and 37°C. Data shown are the UV absorption profiles of the eluted muropeptides in duplicates. Important peaks are labeled by numbers and the corresponding muropeptides are indicated in

Table S1. (C) Muropeptide composition of the peptidoglycan purified from the WT and  $\Delta elyC$  cells growing at 21°C and 37°C. The diagram presents the relative amount of three independent cultures (%) of monomers, dimers, trimers, dipeptide (di), tripeptide (tri) and tetrapeptide (tetra) containing muropeptides, lipoprotein-bound muropeptides (Lpp) and muropeptides with a residue of (1-6 anhydro) N-acetylmuramicacid (Anhydro). The level of crosslink represents the proportion of crosslinked peptide side chains, calculated on dimers and trimers content.

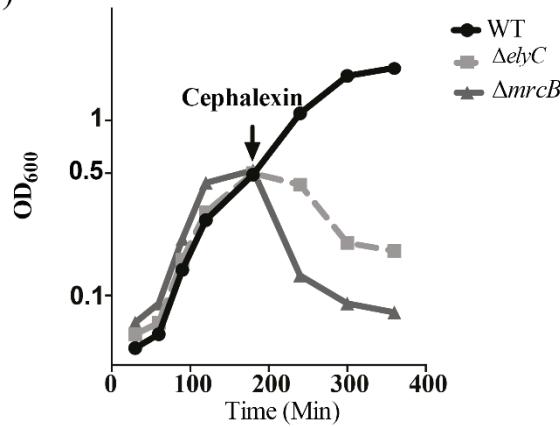
A)

Strain	MIC (ug/ml)				
	Chloramphenicol	Ampicillin	Penicillin G	Cephalexin	Cefsulodin
WT	8	6	48	12	40
$\Delta elyC$	8	3	24	6-8	30
$\Delta mrcB$	8	3	16-24	3	1.5

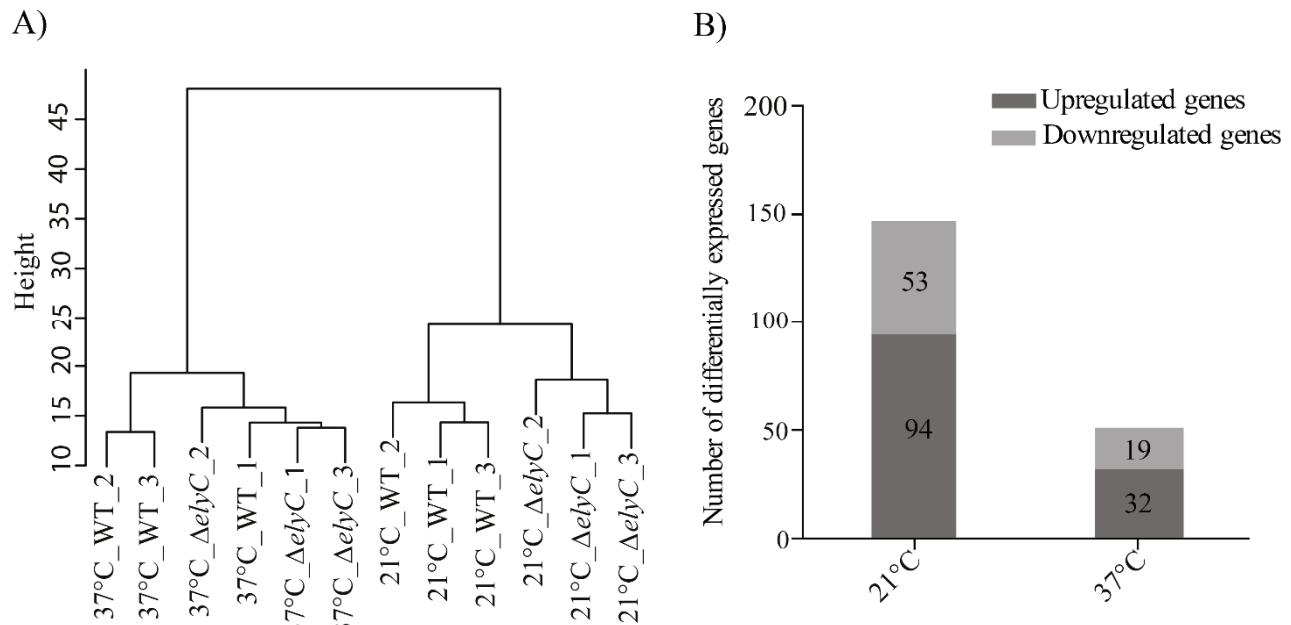
B)



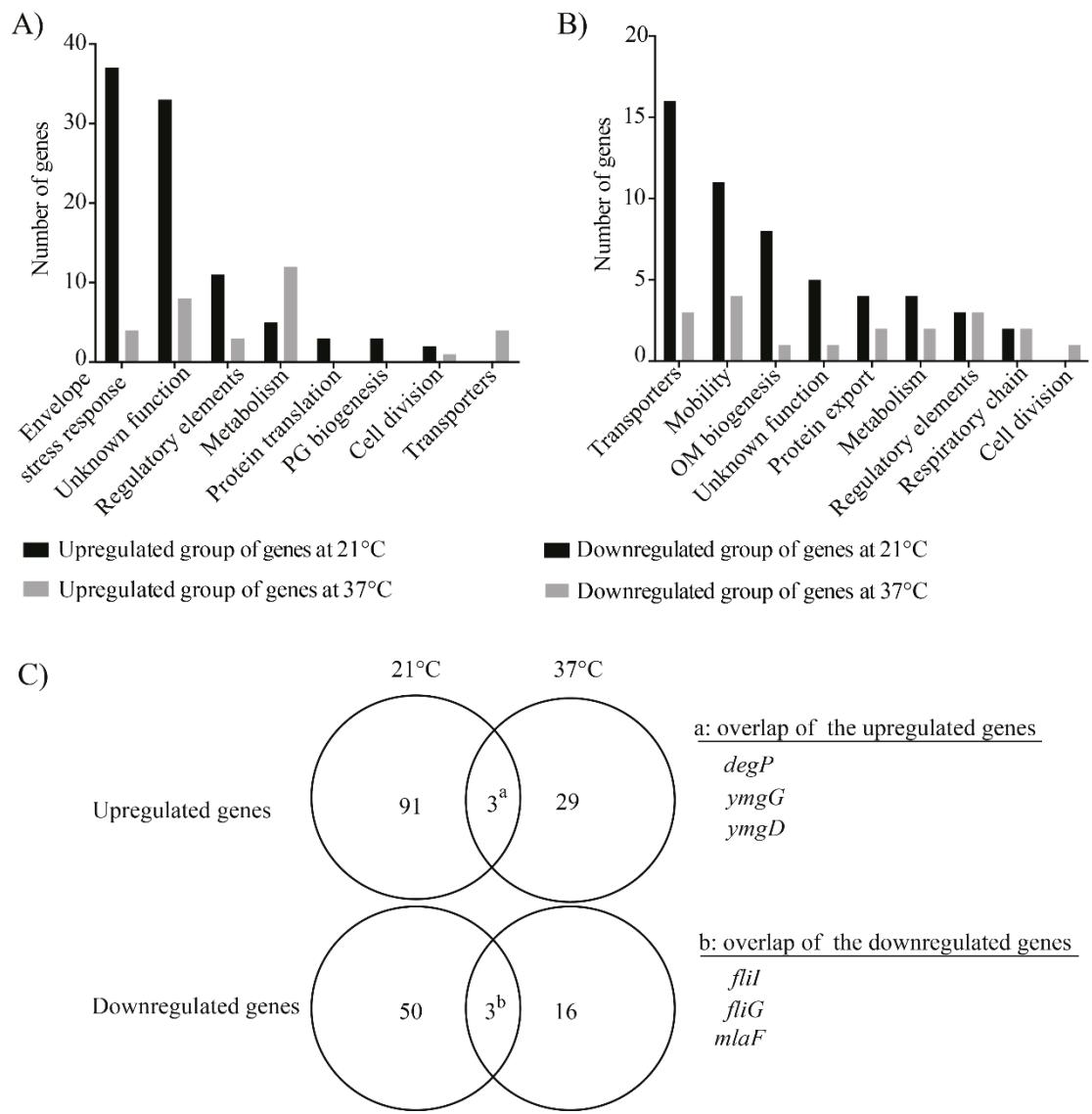
C)



**Figure 3. The mutant  $\Delta elyC$  is sensitive to  $\beta$ -lactams antibiotics at 37°C.** (A). Minimum inhibitory concentrations (MIC) of  $\beta$ -lactams antibiotics chart for the strains indicated in the table. The MIC were done for three independent experiments. (B, C). Cell from the WT,  $\Delta elyC$  and  $\Delta mrcB$  were grown at 37°C until OD<sub>600</sub> of 0.5 and treated either in (B) with Ampicillin (30 ug/ml) and in (C) with Cephalexin (30 ug/ml). The arrow indicates the point of addition of the antibiotic



**Figure 4. Global representation of the RNAseq analysis data of the samples.** The results are from the analysis of the transcriptome of three biological replicates of WT and  $\Delta$ elyC cells growing to an OD<sub>600</sub> of 0.35 in LB media at 21°C and 37°C. (A) Hierarchical clustering of the RNAseq samples, based on the count after variance stabilization transformation with DESeq2 (17). (B) Global classification of differentially expressed genes into upregulated ones and downregulated ones in the  $\Delta$ elyC mutant strain comparably to the WT strain at 21°C and 37°C. The genes were considered to be differentially expressed with a significant Benjamini-Hochberg adjusted p-values (p-adjust) < 0.05



**Figure 5. Functional classification of genes differentially expressed in the *ΔelyC* mutant comparatively to wild-type strain at 21°C and 37°C.** (A, B) Functional group classification of the upregulated genes (A) and downregulated genes (B) in the *ΔelyC* mutant at both temperatures. (C) Overlap of the differentially expressed genes in the *ΔelyC* mutant at 21°C vs 37°C.

## Supplementary Materials

**Tables S1.** Muropeptide relative abundance.

Peaks	Muropeptides	37°C		21°C	
		WT	$\Delta elyC$	WT	$\Delta elyC$
1	<b>M3:</b> GlcNAc-MurNAc-L-Ala-D-Glu-DAP	7.21	9.07	9.33	10.25
2	<b>M4G:</b> GlcNAc-MurNAc-L-Ala-D-Glu-DAP-Gly	0.59	0.70	1.19	0.80
3	<b>M4:</b> GlcNAc-MurNAc-L-Ala-D-Glu-DAP-D-Ala	55.28	53.18	50.68	52.93
4	<b>M2:</b> GlcNAc-MurNAc-L-Ala-D-Glu	1.50	1.60	2.30	1.79
5	<b>M3Lpp:</b> GlcNAc-MurNAc-L-Ala-D-Glu-DAP-Lys-Thr (Brown's lipoprotein)	5.44	5.56	5.17	4.76
6	<b>D33:</b> M3-M3 (crosslinked at DAP-DAP)	0.16	0.25	0.43	0.53
7	<b>D34:</b> M3-M4 (crosslinked at DAP-DAP)	1.39	1.59	2.27	2.36
8	<b>D43:</b> M4-M3 (crosslinked at D-Ala-DAP)	1.82	2.42	2.81	3.38
9	<b>D44:</b> M4-M4 (crosslinked at D-Ala-DAP)	21.59	20.45	20.56	18.30
10	<b>D43Lpp:</b> M4-M3Lpp (crosslinked at D-Ala-DAP)	1.92	1.95	2.05	1.45
11	<b>T444:</b> M4-M4-M4 (crosslinked at D-Ala-DAP and D-Ala-DAP)	1.19	1.41	1.44	1.57
12	<b>D43N:</b> M4-M3 anhydro (crosslinked at D-Ala-DAP)	0.31	0.32	0.40	0.29
13	<b>D44N:</b> M4-M4 anhydro (crosslinked at D-Ala-DAP)	1.17	1.04	1.01	0.98
14	<b>T444N:</b> M4-M4-M4 anhydro (crosslinked at D-Ala-DAP and D-Ala-DAP)	0.42	0.44	0.36	0.62

The relative molar abundance of the interesting peaks indicated in the chromatograms (Fig. 2B) is calculated from the relative area of every peak and expressed as mean % value from three independent samples. Statistical analysis: t-test comparing each sample to the WT in each condition. Asterisks indicate significant differences, p-value < 0.01. Values represent mean from three independent cultures.

**Tables S2.** Muropeptide composition.

	37°C		21°C	
Parameter	WT	$\Delta elyC$	WT	$\Delta elyC$
Monomers	70.02	70.12	68.67	70.52
Dimers	28.36	28.03	29.53	27.29
Trimers	1.61	1.86	1.80	2.19
Di	1.50	1.60	2.30	1.79
Tri	12.81	14.88	14.93	15.54
Tetra	85.69	83.51	82.77	82.67
Lpp	7.37	7.51	7.21	6.20
Anhydro	1.90	1.81	1.77	1.88
Crosslink	29.17	28.96	30.43	28.38

This table summarizes the relative molar abundance (%) of the parameters represented in Fig.2C. Statistical analysis: t-test comparing each sample to the WT in each condition. Asterisks indicate significant differences, p-value < 0.01. Values represent mean from three independent cultures.

**Table S3.** The raw read statistics of the RNAseq samples.

Name	Run	Run type	Library type	Reads	Cycles	Duplicates
21°C- <i>ΔelyC</i> -1	2853	PAIRED-END	rRNA_depleted strands	19 051 789	107	44%
21°C- <i>ΔelyC</i> -2	2853	PAIRED-END	rRNA_depleted strands	20 448 333	107	44%
21°C- <i>ΔelyC</i> -3	2853	PAIRED-END	rRNA_depleted strands	22 342 632	107	44%
21°C-WT-1	2853	PAIRED-END	rRNA_depleted strands	22 096 739	107	44%
21°C-WT-2	2853	PAIRED-END	rRNA_depleted strands	18 372 432	107	44%
21°C-WT-3	2853	PAIRED-END	rRNA_depleted strands	18 480 598	107	44%
37°C- <i>ΔelyC</i> -1	2853	PAIRED-END	rRNA_depleted strands	18 991 544	107	44%
37°C- <i>ΔelyC</i> -2	2853	PAIRED-END	rRNA_depleted strands	20 781 597	107	44%
37°C- <i>ΔelyC</i> -3	2853	PAIRED-END	rRNA_depleted strands	18 996 974	107	44%
37°C-WT-1	2853	PAIRED-END	rRNA_depleted strands	22 011 741	107	44%
37°C-WT-1	2853	PAIRED-END	rRNA_depleted strands	26 102 841	107	44%
37°C-WT-1	2853	PAIRED-END	rRNA_depleted strands	20 248 723	107	44%

## CHAPITRE 4 - Discussion

### 4.1 - Importance du facteur ElyC dans la biosynthèse du PG à 21 °C et 37 °C

L'importance du facteur ElyC dans le maintien de l'intégrité du peptidoglycane chez *E. coli* à température pièce a été établie par Paradis-Bleau *et al.* (Paradis-Bleau et al., 2014). Cette étude a démontré que la délétion de la région chromosomique qui code pour le facteur ElyC n'est pas létale. Cependant, elle provoque la lyse du mutant après environ 8 heures de croissance à température pièce. L'analyse microscopique avait démontré la présence de bourgeonnements et un gonflement des cellules mutantes et finalement leur éclatement. Le phénotype de lyse, observé au microscope, avait suggéré un défaut dans la rigidité du PG. Cette hypothèse a été confirmée à la suite de l'analyse du niveau de biosynthèse du PG chez le mutant  $\Delta elyC$  à température pièce. Ils ont démontré que le niveau d'incorporation de l'acide amine DAP radioactif dans le PG, chez le mutant  $\Delta elyC$ , diminue brusquement après 5.5 heures de croissance (Paradis-Bleau et al., 2014). Cela suggère que le défaut de PG débute à environ un temps de génération cellulaire précédent la lyse.

Dans notre étude (chapitre 2.3), nous avons utilisé une méthode d'analyse de PG différente de celle de Paradis-Bleau *et al.* 2014 ; nous avons analysé la quantité de PG et sa composition chez le mutant  $\Delta elyC$ , juste avant le début de la lyse, par la méthode de UPLC. Nous avons observé une diminution de plus de 55 % de la quantité de PG chez le mutant comparativement à une souche sauvage. Ce résultat concorde avec les données obtenues par le test de DAP radioactif et confirme le défaut de PG chez le mutant  $\Delta elyC$ . La lyse est donc due au fait que les cellules ont perdu plus de la moitié de leur contenu en PG (Prats & de Pedro, 1989).

L'insertion de nouveaux matériaux dans le PG nécessite son clivage par des hydrolases. Ces dernières forment des pores dans le PG préexistant où sera incorporé le matériel nouvellement synthétisé. En absence de biosynthèse, la rigidité du PG est fragilisée, ce qui diminue sa résistance à la pression osmotique et permet l'expansion du volume cellulaire jusqu'à l'éclatement de la bactérie. Les bourgeonnements sont le résultat de la pénétration de la membrane interne à travers les pores dans le PG, formés par les hydrolases. Ce phénotype est

observé spécifiquement chez les bactéries dont le PG est fragilisé à la suite d'un traitement avec des  $\beta$ -lactamines (Huang, Mukhopadhyay, Wen, Gitai, & Wingreen, 2008; Tomasz, 1979) ou chez des mutants présentant un défaut de biosynthèse du PG (Inoue et al., 2008; Paradis-Bleau et al., 2010). Ainsi, le mécanisme de lyse du mutant  $\Delta elyC$  confirme que la mort de ces cellules est une conséquence directe du défaut de PG.

L'analyse de la composition du PG chez le mutant  $\Delta elyC$  ne révèle aucune différence significative chez le mutant, comparativement à la souche sauvage. Ce résultat suggère que la diminution de la quantité de PG en absence d'ElyC n'est pas la conséquence d'un changement dans la composition de PG (changement qui aurait pu être causé soit par une désactivation d'une ou plusieurs hydrolases, soit par une hyper-activation). En effet, le maintien de l'intégrité du PG nécessite un équilibre entre le niveau d'hydrolyse et de biosynthèse. Les hydrolases de type endopeptidases, amidases ou transglycosylases lytiques clivent 40 à 50 % de PG préexistant par génération cellulaire (Kraft et al., 1998). Cette perte de PG est compensée par la biosynthèse et l'insertion du nouveau matériel dans des conditions physiologiques. Cependant, chez le mutant  $\Delta elyC$ , la composition du PG est similaire à la souche sauvage, indiquant que les hydrolases sont probablement activées de la même manière que chez la souche sauvage. En revanche, la biosynthèse est bloquée et l'équilibre est altéré.

L'absence du facteur ElyC à 37 °C n'induit pas de défaut de croissance. Le mutant croît normalement et ne lyse pas vers la fin de la phase exponentielle. Cependant, l'analyse du PG révèle une diminution significative de la quantité de PG, qui est d'environ 38 % (Chapitre 3). Cette diminution ne semble pas être assez importante pour causer la lyse du mutant. En effet, il a déjà été démontré qu'une diminution de la quantité de PG qui n'excède pas les 50 %, ne provoque pas de changements morphologiques, ni de lyse bactérienne (Prats & de Pedro, 1989). De plus, le mutant  $\Delta elyC$ , à 37 °C, est plus sensible aux  $\beta$ -lactamines qui ciblent le PG, comparativement à la souche sauvage, et est même aussi sensible qu'un mutant qui n'exprime pas PBP 1B. Ce résultat confirme bien la présence d'un défaut au niveau du PG chez le mutant à 37 °C. L'analyse microscopique des cellules du mutant  $\Delta elyC$  ne montre pas de changement morphologique, mis à part un léger élargissement des cellules. Cet élargissement pourrait être la conséquence d'une diminution de la rigidité du PG, due à une perte significative de la quantité de ce composant cellulaire. De plus, l'analyse de la composition du PG chez le mutant  $\Delta elyC$  à

37 °C ne montre pas une différence significative ; ce qui laisse supposer que le défaut de PG à 37 °C est dû à un blocage du mécanisme de biosynthèse, tout comme à température pièce.

Les résultats de l'analyse du PG par UPLC ont confirmé le défaut de PG provoqué par l'absence d'ElyC à température pièce. Ils ont montré que la lyse était induite par la diminution de plus de 50 % de la quantité de PG à 21 °C. Ils ont aussi confirmé le fait que le défaut de PG est provoqué par un arrêt de sa biosynthèse. Nous avons démontré pour la première fois que ElyC joue aussi un rôle dans la biosynthèse du PG à 37 °C. Ces résultats suggèrent que ElyC est impliquée directement dans la biosynthèse du PG ou indirectement, par exemple, par le repliement, la localisation ou la régulation des facteurs impliqués dans la biosynthèse du PG.

## 4.2 – Défaut de repliement des protéines dans l'enveloppe chez le mutant *ΔelyC*

Pour étudier le rôle du facteur ElyC, nous avons procédé à l'identification de suppresseurs génétiques du phénotype de lyse à 21 °C et à la caractérisation du mécanisme de suppression. L'identification de suppresseurs a été réalisée grâce à une approche par candidats, basée sur une hypothèse de départ. Cette hypothèse suggère que le blocage de la biosynthèse du PG est dû à un problème de repliement des protéines, causé par des dommages oxydatifs. En effet, dans notre laboratoire, nous avons démontré que le mutant *ΔelyC* présente un défaut de stress oxydatif à 21 °C. Lorsque ce défaut est corrigé, la biosynthèse du PG est restaurée. Cela suggère que le stress oxydatif est responsable de l'arrêt de production de PG (données non publiées). Sachant que les protéines constituent la principale cible du stress oxydatif et que les enzymes de biosynthèse du PG peuvent être désactivées par des dommages oxydatifs, nous avons émis l'hypothèse que le stress oxydatif bloque la production de PG en désactivant de certaines protéines (Corcoran & Cotter, 2013).

Cette stratégie nous a permis d'identifier deux chaperonnes périplasmiques comme suppresseurs multicopies de la lyse du mutant à 21 °C (chapitre 2). Il s'agit de DsbG et Spy. DsbG est connue comme étant une réductase périplasmique qui réduit les protéines contenant une cystéine libre pour protéger cette cystéine de l'oxydation par les ROS (Depuydt et al., 2009). En premier lieu, nous avons supposé que DsbG agissait par ce mécanisme pour rétablir le défaut de croissance du mutant *ΔelyC*. Cependant, nous avons démontré que l'activité catalytique de DsbG n'était pas nécessaire pour le mécanisme de suppression. En revanche, DsbG supprime la

lyse du  $\Delta$ *elyC* mutant par son activité chaperonne, qui est indépendante de son site catalytique. Nous avons démontré, pour la première fois, que DsbG a une activité chaperonne *in vivo*. En effet, Shao *et al.* (Shao et al., 2000) avaient démontré que DsbG présente une activité chaperonne, *in vitro*. Ils avaient suggéré que la propriété chaperonne de DsbG était liée à son activité réductase pour permettre une meilleure efficacité. Cependant, chez le mutant  $\Delta$ *elyC*, DsbG agit uniquement par son activité chaperonne car la suppression du phénotype de lyse est totale même en absence de la forme réductase. De plus, DsbG n'agit pas sur ses substrats liés à son activité réductase pour corriger la lyse du mutant.

Le deuxième suppresseur identifié est la chaperonne périplasmique Spy. Cette chaperonne est exprimée massivement et rapidement en présence d'agents dénaturant les protéines (Neidhardt, VanBogelen, & Vaughn, 1984; Quan et al., 2011; Rutherford et al., 2010). De plus, son induction est régulée par les systèmes de réponse au stress dans l'enveloppe, Bae et Cpx. Ces deux systèmes sont activés en présence de protéines mal repliées dans l'enveloppe. Chez le mutant  $\Delta$ *elyC* à 21 °C, Spy est deux fois plus exprimée que chez la souche sauvage (Table 1 du chapitre 3) et le système Cpx est activé, ce qui suggère un problème de repliement des protéines dans l'enveloppe. Cependant, l'induction de Spy chez le mutant  $\Delta$ *elyC* ne suffit pas pour rétablir le phénotype, alors que la surexpression de Spy par un plasmide multi-copies permet de corriger la lyse du mutant. Spy est généralement induite massivement en présence de protéines instables dans le périplasme ou d'agents dénaturants pouvant atteindre entre 5-48 % du volume total de protéines dans le périplasme (Brynildsen & Liao, 2009; Quan et al., 2011; Rutherford et al., 2010), ce qui suggère que Spy fonctionne efficacement à forte concentration.

Le défaut de repliement des protéines chez le mutant  $\Delta$ *elyC* a été, en premier lieu, suggéré dû à la présence de stress oxydatif et par la suite il a été davantage appuyé par l'identification des chaperonnes DsbG et Spy comme suppresseurs multicopies du phénotype de lyse. Cette hypothèse a été finalement confirmée par l'analyse du niveau d'agrégation des protéines chez le mutant. Nous avons démontré que la quantité d'agrégats protéiques est deux fois plus importante en absence de ElyC que dans une souche sauvage. La surexpression de DsbG et Spy, quant à elle, rétablit le niveau d'agrégation à son niveau normal, suggérant ainsi que le défaut de repliement est au niveau du périplasme, et que DsbG et Spy jouent le rôle de chaperonnes.

La surexpression de DsbG et Spy rétablit totalement le défaut de PG chez le mutant  $\Delta elyC$ . La suppression d'un phénotype de lyse, causée par un défaut de PG, n'est pas communément corrigée par la surexpression de chaperonnes ; ainsi chez un mutant PBP1B, la surproduction DsbG et Spy ne corrige pas le phénotype CPRG<sup>+</sup> de ce mutant. Cela signifie que chez le mutant  $\Delta elyC$ , le défaut de PG est spécifiquement affecté par un problème de repliement des protéines dans l'enveloppe. Cependant, il est jusqu'aujourd'hui difficile de dire si le défaut de repliement des protéines affecte uniquement celles impliquées dans la biosynthèse du PG ou différentes classes de protéines. De plus, la cause principale du défaut de repliement des protéines n'est pas encore établie, le stress oxydatif pourrait être à l'origine de ce défaut.

#### **4.3 – L'activation des systèmes de réponse au stress dans l'enveloppe chez le mutant $\Delta elyC$**

L'importance physiologique du facteur ElyC, à 21 °C et à 37 °C, est aussi démontrée par les résultats de l'ARNseq. En effet, un changement transcriptomique significatif est observé chez le mutant  $\Delta elyC$  dans les deux températures. En revanche, le nombre de gènes différemment exprimés en absence du facteur ElyC est plus élevé à 21 °C qu'à 37 °C. Ces données sont en concordance avec le niveau de gravité du phénotype dans les deux conditions de températures.

L'absence du facteur ElyC à 21 °C induit l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la réponse de la bactérie aux stress affectant l'enveloppe. On retrouve des gènes codant pour des protéines impliquées dans le maintien de la qualité du protéome de l'enveloppe, la régulation de l'osmolarité cellulaire, la formation d'expolysaccharides (EPS) et la protection du PG. L'expression de ces gènes est induite par l'activation de plusieurs systèmes de réponse aux stress de l'enveloppe. On retrouve les systèmes Cpx, Rcs, EnvZ/OmpR, rpoS ( $\sigma^S$ ), et rpoE ( $\sigma^E$ ).

L'activation du système Cpx et  $\sigma^E$  est souvent reliée à un problème de repliement des protéines. L'induction du système Cpx est associée à des altérations au niveau de la membrane interne (Jones et al., 1997; Mileykovskaya & Dowhan, 1997), et à un défaut de repliement des protéines dans le périplasme et dans la membrane interne (Raivio, 2014; Slamti & Waldor, 2009). L'activation du Cpx se traduit par l'expression de gènes codant pour des enzymes du repliement des protéines, des chaperonnes et des protéases. Parmi les gènes induits chez le

mutant  $\Delta elyC$  à 21 °C, on retrouve ceux régulés par le système Cpx, comme la protéase DegP, la PPIase PpiD et la chaperonne Spy. L'activation du système  $\sigma^E$  a été associée à un problème de repliement des protéines dans la membrane externe (Dartigalongue et al., 2001). Parmi les gènes du régulon du système  $\sigma^E$  induits chez le mutant  $\Delta elyC$  à 21 °C, se trouve celui qui code pour la chaperonne et PPIase, FkpA. Dans certains cas, il a été démontré qu'un même signal pouvait activer le Cpx et le  $\sigma^E$  en même temps. Par exemple, l'accumulation de sous unité du P-pili ou de ECA dans la membrane interne entraîne l'activation des deux systèmes (Danese & Silhavy, 1997; Jones et al., 1997). Chez le mutant  $\Delta elyC$  à 21 °C, l'activation de ces systèmes pourrait être la conséquence du défaut de repliement des protéines démontrées dans le chapitre 2. La localisation exacte de ce défaut reste, quant à elle, inconnue car les deux systèmes peuvent être activés par le même signal.

L'activation du système Rcs est associée à la production de biofilm et de plusieurs structures de surface comme : l'acide colanique présent dans la capsule; le LPS; et des gènes d'osmorégulation (Majdalani & Gottesman, 2005). Dans notre étude, nous avons démontré que plusieurs gènes associés à ces mécanismes et régulés par le Rcs, sont induits chez le  $\Delta elyC$  mutant à 21 °C ; parmi eux : les gènes de production de l'acide colanique (*wza*, *wzc*, *wzb*, *wcaA*, *wcaG*), et les gènes impliqués dans la réponse au stress osmotique (*omsB* et *bdm*). Ceci démontre que le système Rcs est activé. Dans la littérature, l'induction du système Rcs est associée à des perturbations dans la membrane externe et le peptidoglycane. L'activation de ce système a été observée en présence de dommages dans le PG, engendrés par le lysozyme ou par des  $\beta$ -lactamines (Callewaert et al., 2009; Hinchliffe et al., 2008). Ainsi, l'induction du Rcs chez le mutant  $\Delta elyC$  à 21 °C pourrait être causée par le défaut de PG. L'activation du système Cpx chez le mutant  $\Delta elyC$  pourrait aussi être associée au défaut de PG. En effet, une étude récente a montré que le Cpx est activé lorsque l'intégrité du PG est menacée (Delhaye et al., 2016).

Le peptidoglycane fournit une résistance mécanique contre la pression osmotique venant du cytoplasme (Desmarais et al., 2015). Lorsque l'intégrité du PG est affectée, la bactérie résiste moins bien aux variations de pression osmotique, ce qui peut entraîner la lyse. Chez le mutant  $\Delta elyC$  à 21 °C, nous avons observé une induction de plusieurs gènes impliqués dans différents mécanismes de résistance au stress osmotique. Parmi ces mécanismes se trouvent la biosynthèse du tréhalose et d'expolysaccharides, et l'activation du système de réponse au stress osmotique,

EnvZ/OmpR. Les gènes de la biosynthèse du tréhalose (*otsA* et *otsB*) ainsi que le régulateur transcriptionnel de la biosynthèse de ce sucre, TreR (Boos, Ehmann, Bremer, Middendorf, & Postma, 1987), sont induits chez le mutant  $\Delta elyC$  à 21 °C. La production du tréhalose a comme but d'augmenter l'osmolarité du cytoplasme (Csonka, 1989). L'augmentation de la pression osmotique induit aussi la production d'EPS suite à l'expression des gènes des operons, *wca* et *yjb*. Les gènes de l'opéron *wca* sont impliqués dans la production de l'acide colanique et ceux de l'opéron *yjb* dans la production d'un EPS non identifié jusque-là (Ionescu & Belkin, 2009; Sledjeski & Gottesman, 1996). Les gènes de l'opéron *wca* et *yjb* sont aussi induits chez le mutant  $\Delta elyC$  à 21 °C. Le système EnvZ/OmpR a été impliqué dans la régulation de la réponse au stress osmotique (Stock et al., 2000). Nous retrouvons d'ailleurs plusieurs gènes du régulome de EnvZ/OmpR qui sont induits, ce qui suggère que ce système est activé chez le mutant à 21 °C. La présence d'une réponse cellulaire pour la résistance au stress osmotique chez le mutant  $\Delta elyC$  à température pièce est probablement reliée au défaut de PG.

Le nombre de gènes différemment exprimés à 37 °C est moins élevé qu'à 21 °C. De plus, l'intensité de la réponse au stress dans l'enveloppe est moins importante. Parmi les gènes induits, on retrouve ceux régulés par le système Cpx (*degP*),  $\sigma^E$  (*depA*, *hdhA*) et  $\sigma^S$  (*MscL*), suggérant que ces systèmes de réponse au stress dans l'enveloppe sont activés. Cependant, leur activation semble être modérée comparativement à 21 °C, car le nombre gènes, dont l'induction est associée à l'activation de ces systèmes, est moins important chez le mutant  $\Delta elyC$  à 37 °C. De plus, les systèmes Rcs et EnvZ/OmpR ne semblent pas être activés dans cette condition. Plusieurs gènes induits à 37 °C chez le mutant sont impliqués dans le métabolisme ainsi que dans le transport membranaire de molécules comme des ions et des sucres.

#### **4.4 – Diminution de l'expression des gènes codant des composants de la chaîne respiratoire chez le $\Delta elyC$**

Parmi les gènes dont l'expression diminue chez le mutant  $\Delta elyC$ , se trouvent ceux qui codent pour des composants de la chaîne respiratoire de *E. coli*, les gènes *cyoB* et *cyoC* à 21 °C et les gènes *nuoM* et *nuoN* à 37 °C. Le gène *cyoB* code pour la sous unité I du cytochrome *bo*,

cette sous unité est impliquée dans le transport des protons du cytoplasme vers le périplasme, ce qui contribue à la création de la force protomotrice « Proton motive force » (PMF) (Thomas, Puustinen, Alben, Gennis, & Wikstrom, 1993). Le gène *cyoC* code pour la sous unité III du cytochrome *bo* et son expression est importante pour la formation d'un complexe fonctionnel (Nakamura, Saiki, Mogi, & Anraku, 1997). La complexe terminale oxydase cytochrome *bo* réduit l'oxygène lors de la respiration en aérobie avec comme accepteur final d'électrons, l'oxygène. L'expression des gènes codant pour la chaîne respiratoire de *E. coli* dépend de facteurs extérieurs comme la disponibilité en oxygène (Gunsalus, 1992). En présence de fortes concentrations d'oxygène, le cytochrome *bo* est prédominant. De plus, il présente une meilleure affinité pour l'oxygène, contrairement au cytochrome de type *bdi* (Gunsalus, 1992). Il est tentant de suggérer que la diminution de l'expression de *cyoB* et *cyoC* pourrait être liée à la présence de stress oxydatifs chez le mutant  $\Delta elyC$  à 21 °C. En effet, la bactérie pourrait réguler le degré de fonctionnement de la chaîne de transport d'électrons à un niveau bas pour limiter l'utilisation de l'oxygène qui est la source de la formation des dérivés réactifs de l'oxygène.

NuoM et NuoN sont des sous unités de la NADH déshydrogénase complexe I et semblent être impliquées dans la translocation des protons (Friedrich, 1998). La NADH déshydrogénase I est composée de 14 sous-unités ; l'absence d'une des sous-unités induit un assemblage partiel de la NADH déshydrogénase et un défaut de croissance en aérobie (Erhardt et al., 2012). La NADH déshydrogénase est la porte d'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire. Elle permet le transfert des électrons du NADH vers les ubiquinones en même temps qu'elle transfère les protons du cytoplasme vers le périplasme. Comme pour le cytochrome *bo*, l'expression des gènes de la NADH déshydrogénase est régulée par la disponibilité de l'oxygène, mais aussi par la disponibilité en énergie. En effet, l'expression de NADH déshydrogénase complexe I est favorisée quand l'énergie est limitée car la translocation des protons par cette enzyme nécessite moins d'énergie que si NADH déshydrogénase complexe II l'avait effectué (Tran, Bongaerts, Vlad, & Unden, 1997). Contrairement à 21 °C, il ne semble pas y avoir de stress oxydatifs à 37 °C, ce qui suggère que la cause de la diminution de l'expression de *nuoM* et *nuoN* est autre que le stress oxydatif.

La diminution de l'expression des gènes *cyoB*, *cyoC*, *nuoM* et *nuoN* chez le mutant  $\Delta elyC$  pourrait être associée à l'activation du système Cpx. En effet, il a été démontré dans des études antérieures que l'activation du Cpx chez *E. coli* diminue directement l'expression des

gènes codants pour le cytochrome *bo* et la NADH déshydrogénase, et que cette répression a comme effet d'augmenter la résistance au stress qui affecte l'enveloppe (Bury-Mone et al., 2009; Guest, Wang, Wong, & Raivio, 2017; Raivio et al., 2013). Il a été proposé que la diminution de l'expression des gènes *cyo* et *nuo* par le Cpx pouvait avoir comme but de ralentir le trafic des protéines dans la membrane interne et permettre la biogenèse et la réparation des protéines déjà présentes (Guest et al., 2017).

#### **4.5 – Diminution de l'expression des gènes de la machinerie d'export des protéines chez le $\Delta elyC$**

La plupart des protéines de l'enveloppe sont transloquées du cytoplasme vers le périplasme par le système général de sécrétion, Sec (voir chapitre 1 partie 1.2.1). Ce système est composé d'un canal de translocation SecYEG, du complexe accessoire SecDF/YajC, de l'ATPase et SecA. L'insertion des protéines dans la membrane interne est quant à elle assurée par l'insertase YidC et facilitée par le complexe accessoire SecDF/YajC. L'insertion des protéines membranaires se fait dépendamment ou indépendamment du système Sec. Chez le mutant  $\Delta elyC$  à 21 °C, nous avons observé la diminution de l'expression des gènes codant pour les protéines du complexe accessoire SecD et SecF, l'ATPase, SecA, et l'insertase et foldase YidC. Cette diminution pourrait affecter le niveau et l'efficacité de l'export des protéines, leur insertion et leur repliement dans la membrane interne. En effet, le mécanisme d'export nécessite l'énergie libérée lors de l'hydrolyse de l'ATP par SecA et des protéines SecDF qui utilisent l'énergie du gradient de proton afin d'augmenter l'efficacité de l'export (Pogliano & Beckwith, 1994; Tsukazaki et al., 2011). D'autre part, l'insertion et le repliement des protéines dans la membrane interne nécessite YidC et l'énergie du gradient de proton exploité par le complexe SecDF\YajC (Komar et al., 2016; Nouwen & Driessen, 2002). Le mécanisme de régulation de l'expression de ces composants du système d'export n'est pas connu. L'induction du gène *secA* est activée par le Cpx (Dorel, Lejeune, & Rodrigue, 2006). Cependant, le mécanisme d'inhibition de la transcription de ce gène n'a pas été identifié. On pourrait supposer que la diminution de l'expression de ces gènes est la conséquence du défaut de repliement des protéines dans l'enveloppe (démontré dans le chapitre 2) et/ou un défaut au niveau de la membrane interne, traduit par l'activation du système Cpx. Cela pourrait avoir comme but de ralentir le trafic à travers la membrane interne et limiter la quantité de protéines dans l'enveloppe le temps

de réparer les défauts déjà présents. Il ne semble pas avoir été démontré dans la littérature que le Cpx pouvait diminuer l'expression des gènes *secA*, *secF*, *secD* et *yidD*. En revanche, l'accumulation de protéines mal repliées, induite par la délétion du gène *yidC* ou *secY*, active fortement le Cpx (Shimohata, Nagamori, Akiyama, Kaback, & Ito, 2007; Wang, Kuhn, & Dalbey, 2010).

#### 4.6 – L'effet de la température sur le phénotype du mutant $\Delta elyC$

La délétion du gène *elyC* induit une lyse de la bactérie à basse température, mais le mutant croît aussi bien qu'une souche sauvage à 37 °C. Ce type de mutant est appelée « cold sensitive mutant » (Cs). Les mutants Cs sont rares (Baliga et al., 2016) ; les gènes mutés sont généralement impliqués dans des mécanismes qui présentent une ou plusieurs étapes sensibles au froid. On retrouve des mutations dans des gènes ayant un rôle dans la biosynthèse du ribosome (Dammel & Noller, 1993; Guthrie, Nashimoto, & Nomura, 1969; Kirthi, Roy-Chaudhuri, Kelley, & Culver, 2006) ou dans l'export des protéines (Baba et al., 1990; Nouwen & Driessen, 2005; Pogliano & Beckwith, 1993). Le phénotype Cs des mutants défectueux dans d'export des protéines a été associé aux changements de la composition de la membrane interne et à la diminution des interactions hydrophobiques à basse température (Pogliano & Beckwith, 1993; Sugai, Shimizu, Nishiyama, & Tokuda, 2001). Certaines protéines peuvent compenser le défaut causé par l'interaction avec le froid. Cependant, l'absence, la désactivation ou la diminution de l'expression de ces protéines peut induire un phénotype Cs.

Une large classe de mutations affectant les protéines membranaires Sec (SecD, SecE, SecF et SecY) donne un phénotype Cs. Les mutations induisant la diminution de l'expression de *secD* et *secF* manifestent un défaut dans l'export des protéines à 23 °C et 37 °C. Cependant, ce problème est plus prononcé à 23 °C et induit un défaut de croissance des mutants uniquement à basse température (Gardel, Benson, Hunt, Michaelis, & Beckwith, 1987; Gardel, Johnson, Jacq, & Beckwith, 1990). Cela signifie que le phénotype Cs de ces mutants est le résultat de l'interaction entre la mutation et le froid.

Chez le mutant  $\Delta elyC$  à 21 °C, on observe une diminution du niveau d'expression de *secD* et *secF*, qui pourrait entraîner un ralentissement de l'export des protéines et l'insertion de ces dernières dans la membrane interne, provoquant une perturbation au niveau de la membrane interne. Ceci pourrait expliquer le problème de repliement des protéines.

Nous avons démontré dans ce travail que le phénotype Cs du mutant  $\Delta elyC$  est le résultat d'un ralentissement de la biosynthèse du PG amplifié par le froid. Paradis-Bleau *et al* 2014 avaient suggérés que, chez le mutant  $\Delta elyC$  à 21 °C, la biosynthèse du PG était bloquée au niveau de la membrane interne et plus précisément au niveau du transporteur lipidique Und-P. En effet, ils avaient démontré que la surproduction de Und-P ou l'augmentation de sa disponibilité corrige le phénotype de lyse à 21 °C. Cette hypothèse n'a pas été confirmée par nos travaux. Cependant, plusieurs de nos résultats appuient le fait que la biosynthèse du PG est bloquée au niveau d'une ou plusieurs étapes dans la membrane interne. Ces résultats sont l'activation du système de réponse au stress affectant la membrane interne, Cpx, à 21 °C et à 37 °C, la diminution de l'expression de gènes impliqués dans des mécanismes au niveau de la membrane interne (chaîne de transfert d'électrons, l'export des protéines, l'insertion des protéines dans la membrane interne, la biosynthèse du flagelle) et le rétablissement de la biosynthèse du PG par des chaperonnes de l'enveloppe mais pas du cytoplasme. Nos résultats et ceux de Paradis-Bleau *et al* 2014 de même que le fait que ElyC soit une protéine de la membrane interne appuient fortement l'hypothèse que la biosynthèse du PG est bloquée à ce niveau. Dans ce cas, le phénotype Cs pourrait s'expliquer par le changement de la composition de la membrane interne en phospholipides, qui se produit lors du passage de 37 °C à 21 °C. ElyC pourrait être un facilitateur de la biosynthèse du PG au niveau de la membrane interne. Ainsi, en absence d'ElyC le processus de biosynthèse du PG est ralenti au niveau de la membrane, ce ralentissement est d'autant plus important lorsque la composition de la membrane change à 21 °C. ElyC pourrait avoir un rôle direct dans la biosynthèse du PG, ou indirect, par exemple, en ayant un rôle dans la biogénèse des protéines de la membrane interne impliquées dans la biosynthèse du PG.

## Conclusion et Perspectives

Dans cet ouvrage, nous avons voulu élargir nos connaissances quant à la biogenèse de l'enveloppe des bactéries Gram-négatifs. Pour cela, nous avons choisi d'étudier un nouveau facteur de fonction inconnue, important à la biosynthèse du PG à température pièce. Il s'agit du facteur ElyC. Ce facteur a été identifié par Paradis-Bleau *et al* 2014, qui ont montré que le mutant  $\Delta elyC$  présente un blocage du mécanisme de biosynthèse du PG. L'objectif général de mes travaux était de caractériser davantage le phénotype du mutant  $\Delta elyC$  afin de mieux comprendre le rôle du facteur ElyC. Pour ce faire, nous avons procédé à une approche par candidat pour identifier des suppresseurs génétiques de la lyse du mutant  $\Delta elyC$  à 21 °C et caractériser le mécanisme de suppression. De plus, nous avons étudié le phénotype du mutant à 37 °C et analysé la composition du PG et la réponse transcriptomique chez le mutant à 21 °C et à 37 °C. Ce travail a permis de tirer les conclusions suivantes :

La lyse du mutant  $\Delta elyC$  à 21 °C est une conséquence directe d'une réduction de plus de 50 % de la quantité de PG. L'analyse UPLC a montré une diminution du niveau de PG d'environ 55 % chez le mutant à 21 °C. La quantité qui reste ne permet pas aux cellules mutantes de résister efficacement à la pression osmotique. Les images microscopiques ont montré un bourgeonnement et l'éclatement des cellules mutantes à 21 °C. Ce mécanisme de lyse est spécifique aux cellules ayant un défaut dans l'intégrité de leurs PG. Cela confirme davantage la cause de la lyse. Les résultats de l'analyse UPLC ont aussi permis de confirmer que la réduction de la quantité de PG est dû à un blocage dans le mécanisme de biosynthèse et non pas à un problème d'hydrolyse du PG qui ne permettrait pas l'intégration du nouveau matériel.

Le facteur ElyC est aussi important pour la biosynthèse du PG à 37 °C. L'analyse UPLC a montré une diminution d'environ 38 % de la quantité de PG. Cette diminution est importante mais pas suffisante pour entraîner un défaut de croissance (Prats & de Pedro, 1989). Cependant, l'analyse microscopique a montré un élargissement des cellules qui est probablement la conséquence d'une diminution de la rigidité du PG entraînée par une perte significative de la quantité de PG. De plus, la sensibilité du mutant  $\Delta elyC$  à 37 ° aux  $\beta$ -lactamines, qui ciblent le PG, appuie davantage le fait que le PG était déjà fragilisé.

Le mutant  $\Delta elyC$  présente un défaut de repliement des protéines dans l'enveloppe à 21 °C. Ce défaut semble affecter le mécanisme de biosynthèse du PG à cette température. En effet, le rétablissement du niveau d'agrégats protéiques chez le mutant, par la surexpression des chaperonnes DsbG et Spy, corrige le défaut de PG. À ce stade, il n'est pas possible de dire si le défaut de repliement des protéines est la cause directe de l'arrêt de biosynthèse du PG ou un effet parallèle/secondaire qui amplifie le défaut de PG. Il serait intéressant de vérifier si le problème d'agrégation des protéines existe chez le mutant  $\Delta elyC$  à 37 °C, car cela nous permettrait de définir quelles sont les effets liés uniquement à l'absence d'ElyC et non pas ceux induits par l'interaction entre la délétion du gène *elyC* et le froid. En effet, puisque ElyC est aussi important à la biosynthèse du PG à 37 °C, il serait plus intéressant d'étudier les phénotypes engendrés par son absence sans la présence du froid.

Dans cette étude, nous avons identifié une nouvelle fonction de DsbG *in vivo*. En effet, DsbG, surproduite agit comme une chaperonne périplasmique chez le mutant  $\Delta elyC$  à 21 °C. De plus, DsbG n'agit pas sur ses substrats connus de son activité réductase. Nous avons donc identifié une condition physiologique où DsbG devient une chaperonne et agit sur de nouveaux substrats. DsbG pourrait être une chaperonne qui fonctionne à basse température, comme, par exemple, la protéine périplasmique DegP, qui fonctionne comme une protéase à 42 °C et devient une chaperonne en dessous de 28 °C (Sobiecka-Szkatula et al., 2009). Une autre possibilité serait que DsbG devient une chaperonne quand elle est présente à forte concentration, comme la chaperonne Spy (Quan et al., 2011). Il serait donc intéressant de caractériser la fonction chaperonne de DsbG dans le futur.

Le mutant  $\Delta elyC$  exprime un phénotype Cs car le niveau de biosynthèse du PG est affecté par l'absence d'ElyC et s'amplifie dans le froid, provoquant la mort de la bactérie à température pièce et non pas à 37 °C. Dans cette étude, nous avons montré que le mécanisme de biosynthèse du PG peut présenter une sensibilité au froid, comme c'est le cas pour le mécanisme de biosynthèse du ribosome et celui de l'export des protéines. ElyC est donc un facteur important pour un fonctionnement optimal du mécanisme de biosynthèse du PG, du moins chez *E. coli*. Le domaine DUF218, présent chez le facteur ElyC, est très conservé chez les espèces bactériennes, ce qui suggère que ElyC aurait une fonction importante et répandue chez d'autres espèces bactériennes. De ce fait, il serait intéressant d'identifier et de caractériser les

homologues de ElyC chez des bactéries pathogènes. En effet, le mécanisme de biosynthèse du PG étant une excellente cible antibactérienne, l'identification d'une défaillance à son niveau pourrait ainsi mener à la conception d'une nouvelle stratégie antibactérienne.

## Bibliographie

- Andersen, C. L., Matthey-Dupraz, A., Missiakas, D., & Raina, S. (1997). A new *Escherichia coli* gene, *dsbG*, encodes a periplasmic protein involved in disulphide bond formation, required for recycling DsbA/DsbB and DsbC redox proteins. *Mol Microbiol*, 26(1), 121-132.
- Angelini, S., Deitermann, S., & Koch, H. G. (2005). FtsY, the bacterial signal-recognition particle receptor, interacts functionally and physically with the SecYEG translocon. *EMBO Rep*, 6(5), 476-481. doi: 10.1038/sj.embor.7400385
- Arie, J. P., Sassoon, N., & Betton, J. M. (2001). Chaperone function of FkpA, a heat shock prolyl isomerase, in the periplasm of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 39(1), 199-210.
- Arts, I. S., Gennaris, A., & Collet, J. F. (2015). Reducing systems protecting the bacterial cell envelope from oxidative damage. *FEBS Lett*, 589(14), 1559-1568. doi: 10.1016/j.febslet.2015.04.057
- Aulakh, S., Kim, K. H., & Paetzel, M. (2015). Expression and Purification of the Individual Bam Components BamB-E. *Methods Mol Biol*, 1329, 179-188. doi: 10.1007/978-1-4939-2871-2\_14
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., . . . Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol*, 2, 2006 0008. doi: 10.1038/msb4100050
- Baba, T., Jacq, A., Brickman, E., Beckwith, J., Taura, T., Ueguchi, C., . . . Ito, K. (1990). Characterization of cold-sensitive secY mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 172(12), 7005-7010.
- Baliga, C., Majhi, S., Mondal, K., Bhattacharjee, A., VijayRaghavan, K., & Varadarajan, R. (2016). Rational elicitation of cold-sensitive phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(18), E2506-2515. doi: 10.1073/pnas.1604190113
- Banzhaf, M., van den Berg van Saparoea, B., Terrak, M., Fraipont, C., Egan, A., Philippe, J., Vollmer, W. (2012). Cooperativity of peptidoglycan synthases active in bacterial cell elongation. *Mol Microbiol*, 85(1), 179-194. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08103.x

- Barchinger, S. E., & Ades, S. E. (2013). Regulated proteolysis: control of the *Escherichia coli* sigma(E)-dependent cell envelope stress response. *Subcell Biochem*, 66, 129-160. doi: 10.1007/978-94-007-5940-4\_6
- Bardwell, J. C., McGovern, K., & Beckwith, J. (1991). Identification of a protein required for disulfide bond formation in vivo. *Cell*, 67(3), 581-589.
- Beck, K., Wu, L. F., Brunner, J., & Muller, M. (2000). Discrimination between SRP- and SecA/SecB-dependent substrates involves selective recognition of nascent chains by SRP and trigger factor. *EMBO J*, 19(1), 134-143. doi: 10.1093/emboj/19.1.134
- Behrens, S., Maier, R., de Cock, H., Schmid, F. X., & Gross, C. A. (2001). The SurA periplasmic PPIase lacking its parvulin domains functions in vivo and has chaperone activity. *EMBO J*, 20(1-2), 285-294. doi: 10.1093/emboj/20.1.285
- Bennion, D., Charlson, E. S., Coon, E., & Misra, R. (2010). Dissection of beta-barrel outer membrane protein assembly pathways through characterizing BamA POTRA 1 mutants of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 77(5), 1153-1171. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07280.x
- Berkmen, M., Boyd, D., & Beckwith, J. (2005). The nonconsecutive disulfide bond of *Escherichia coli* phytase (AppA) renders it dependent on the protein-disulfide isomerase, DsbC. *J Biol Chem*, 280(12), 11387-11394. doi: 10.1074/jbc.M411774200
- Berks, B. C., Palmer, T., & Sargent, F. (2005). Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway. *Curr Opin Microbiol*, 8(2), 174-181. doi: 10.1016/j.mib.2005.02.010
- Berndt, U., Oellerer, S., Zhang, Y., Johnson, A. E., & Rospert, S. (2009). A signal-anchor sequence stimulates signal recognition particle binding to ribosomes from inside the exit tunnel. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(5), 1398-1403. doi: 10.1073/pnas.0808584106
- Bessette, P. H., Cotto, J. J., Gilbert, H. F., & Georgiou, G. (1999). In vivo and in vitro function of the *Escherichia coli* periplasmic cysteine oxidoreductase DsbG. *J Biol Chem*, 274(12), 7784-7792.
- Bitto, E., & McKay, D. B. (2002). Crystallographic structure of SurA, a molecular chaperone that facilitates folding of outer membrane porins. *Structure*, 10(11), 1489-1498.

- Bitto, E., & McKay, D. B. (2003). The periplasmic molecular chaperone protein SurA binds a peptide motif that is characteristic of integral outer membrane proteins. *J Biol Chem*, 278(49), 49316-49322. doi: 10.1074/jbc.M308853200
- Boos, W., Ehmann, U., Bremer, E., Middendorf, A., & Postma, P. (1987). Trehalase of *Escherichia coli*. Mapping and cloning of its structural gene and identification of the enzyme as a periplasmic protein induced under high osmolarity growth conditions. *J Biol Chem*, 262(27), 13212-13218.
- Bos, M. P., Robert, V., & Tommassen, J. (2007). Biogenesis of the gram-negative bacterial outer membrane. *Annu Rev Microbiol*, 61, 191-214. doi: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093245.
- Bothmann, H., & Pluckthun, A. (1998). Selection for a periplasmic factor improving phage display and functional periplasmic expression. *Nat Biotechnol*, 16(4), 376-380. doi: 10.1038/nbt0498-376
- Brandl, C. J., & Deber, C. M. (1986). Hypothesis about the function of membrane-buried proline residues in transport proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(4), 917-921.
- Braun, M., & Silhavy, T. J. (2002). Imp/OstA is required for cell envelope biogenesis in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 45(5), 1289-1302.
- Brynildsen, M. P., & Liao, J. C. (2009). An integrated network approach identifies the isobutanol response network of *Escherichia coli*. *Mol Syst Biol*, 5, 277. doi: 10.1038/msb.2009.34
- Bury-Mone, S., Nomane, Y., Reymond, N., Barbet, R., Jacquet, E., Imbeaud, S., . . . Bouloc, P. (2009). Global analysis of extracytoplasmic stress signaling in *Escherichia coli*. *PLoS Genet*, 5(9), e1000651. doi: 10.1371/journal.pgen.1000651
- Callewaert, L., Vanoirbeek, K. G., Lurquin, I., Michiels, C. W., & Aertsen, A. (2009). The Rcs two-component system regulates expression of lysozyme inhibitors and is induced by exposure to lysozyme. *J Bacteriol*, 191(6), 1979-1981. doi: 10.1128/JB.01549-08
- CastilloKeller, M., & Misra, R. (2003). Protease-deficient DegP suppresses lethal effects of a mutant OmpC protein by its capture. *J Bacteriol*, 185(1), 148-154.
- Chaddock, A. M., Mant, A., Karnauchov, I., Brink, S., Herrmann, R. G., Klosgen, R. B., & Robinson, C. (1995). A new type of signal peptide: central role of a twin-arginine motif

- in transfer signals for the delta pH-dependent thylakoidal protein translocase. *EMBO J*, 14(12), 2715-2722.
- Chao, K. L., Lim, K., Lehmann, C., Doseeva, V., Howard, A. J., Schwarz, F. P., & Herzberg, O. (2008). The *Escherichia coli* YdcF binds S-adenosyl-L-methionine and adopts an alpha/beta-fold characteristic of nucleotide-utilizing enzymes. *Proteins*, 72(1), 506-509. doi: 10.1002/prot.22046
- Cho, S. H., & Collet, J. F. (2013). Many roles of the bacterial envelope reducing pathways. *Antioxid Redox Signal*, 18(13), 1690-1698. doi: 10.1089/ars.2012.4962
- Cho, S. H., Szewczyk, J., Pesavento, C., Zietek, M., Banzhaf, M., Roszczenko, P., Collet, J. F. (2014). Detecting envelope stress by monitoring beta-barrel assembly. *Cell*, 159(7), 1652-1664. doi: 10.1016/j.cell.2014.11.045
- Christman, M. F., Morgan, R. W., Jacobson, F. S., & Ames, B. N. (1985). Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell*, 41(3), 753-762.
- Chun, S. Y., & Randall, L. L. (1994). In vivo studies of the role of SecA during protein export in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 176(14), 4197-4203.
- Coornaert, A., Lu, A., Mandin, P., Springer, M., Gottesman, S., & Guillier, M. (2010). MiCA sRNA links the PhoP regulon to cell envelope stress. *Mol Microbiol*, 76(2), 467-479. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07115.x
- Corcoran, A., & Cotter, T. G. (2013). Redox regulation of protein kinases. *FEBS J*, 280(9), 1944-1965. doi: 10.1111/febs.12224
- Costerton, J. W., Ingram, J. M., & Cheng, K. J. (1974). Structure and function of the cell envelope of gram-negative bacteria. *Bacteriol Rev*, 38(1), 87-110.
- Csonka, L. N. (1989). Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol Rev*, 53(1), 121-147.
- Dalbey, R. E., Wang, P., & Kuhn, A. (2011). Assembly of bacterial inner membrane proteins. *Annu Rev Biochem*, 80, 161-187. doi: 10.1146/annurev-biochem-060409-092524
- Dammel, C. S., & Noller, H. F. (1993). A cold-sensitive mutation in 16S rRNA provides evidence for helical switching in ribosome assembly. *Genes Dev*, 7(4), 660-670.

- Danese, P. N., Oliver, G. R., Barr, K., Bowman, G. D., Rick, P. D., & Silhavy, T. J. (1998). Accumulation of the enterobacterial common antigen lipid II biosynthetic intermediate stimulates degP transcription in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 180(22), 5875-5884.
- Danese, P. N., & Silhavy, T. J. (1997). The sigma(E) and the Cpx signal transduction systems control the synthesis of periplasmic protein-folding enzymes in *Escherichia coli*. *Genes Dev*, 11(9), 1183-1193.
- Danese, P. N., Snyder, W. B., Cosma, C. L., Davis, L. J., & Silhavy, T. J. (1995). The Cpx two-component signal transduction pathway of *Escherichia coli* regulates transcription of the gene specifying the stress-inducible periplasmic protease, DegP. *Genes Dev*, 9(4), 387-398.
- Dartigalongue, C., Missiakas, D., & Raina, S. (2001). Characterization of the *Escherichia coli* sigma E regulon. *J Biol Chem*, 276(24), 20866-20875. doi: 10.1074/jbc.M100464200
- De Cock, H., Schafer, U., Potgeter, M., Demel, R., Muller, M., & Tommassen, J. (1999). Affinity of the periplasmic chaperone Skp of *Escherichia coli* for phospholipids, lipopolysaccharides and non-native outer membrane proteins. Role of Skp in the biogenesis of outer membrane protein. *Eur J Biochem*, 259(1-2), 96-103.
- de Keyzer, J., van der Does, C., & Driessen, A. J. (2003). The bacterial translocase: a dynamic protein channel complex. *Cell Mol Life Sci*, 60(10), 2034-2052. doi: 10.1007/s00018-003-3006-y
- de Pedro, M. A., & Cava, F. (2015). Structural constraints and dynamics of bacterial cell wall architecture. *Front Microbiol*, 6, 449. doi: 10.3389/fmicb.2015.00449
- Delcour, A. H. (2009). Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim Biophys Acta*, 1794(5), 808-816. doi: 10.1016/j.bbapap.2008.11.005
- Delhaye, A., Collet, J. F., & Laloux, G. (2016). Fine-Tuning of the Cpx Envelope Stress Response Is Required for Cell Wall Homeostasis in *Escherichia coli*. *MBio*, 7(1), e00047-00016. doi: 10.1128/mBio.00047-16
- Denoncin, K., & Collet, J. F. (2013). Disulfide bond formation in the bacterial periplasm: major achievements and challenges ahead. *Antioxid Redox Signal*, 19(1), 63-71. doi: 10.1089/ars.2012.4864

- Denoncin, K., Vertommen, D., Arts, I. S., Goemans, C. V., Rahuel-Clermont, S., Messens, J., & Collet, J. F. (2014). A new role for *Escherichia coli* DsbC protein in protection against oxidative stress. *J Biol Chem*, 289(18), 12356-12364. doi: 10.1074/jbc.M114.554055
- Depuydt, M., Leonard, S. E., Vertommen, D., Denoncin, K., Morsomme, P., Wahni, K., . . . Collet, J. F. (2009). A periplasmic reducing system protects single cysteine residues from oxidation. *Science*, 326(5956), 1109-1111. doi: 10.1126/science.1179557
- Depuydt, M., Messens, J., & Collet, J. F. (2011). How proteins form disulfide bonds. *Antioxid Redox Signal*, 15(1), 49-66. doi: 10.1089/ars.2010.3575
- Desmarais, S. M., Tropini, C., Miguel, A., Cava, F., Monds, R. D., de Pedro, M. A., & Huang, K. C. (2015). High-throughput, Highly Sensitive Analyses of Bacterial Morphogenesis Using Ultra Performance Liquid Chromatography. *J Biol Chem*, 290(52), 31090-31100. doi: 10.1074/jbc.M115.661660
- Donachie, W. D., & Begg, K. J. (1970). Growth of the bacterial cell. *Nature*, 227(5264), 1220-1224.
- Dorel, C., Lejeune, P., & Rodrigue, A. (2006). The Cpx system of *Escherichia coli*, a strategic signaling pathway for confronting adverse conditions and for settling biofilm communities? *Res Microbiol*, 157(4), 306-314. doi: 10.1016/j.resmic.2005.12.003
- du Plessis, D. J., Nouwen, N., & Driessens, A. J. (2011). The Sec translocase. *Biochim Biophys Acta*, 1808(3), 851-865. doi: 10.1016/j.bbapm.2010.08.016
- Dufresne, K., & Paradis-Bleau, C. (2015). Biology and Assembly of the Bacterial Envelope. *Adv Exp Med Biol*, 883, 41-76. doi: 10.1007/978-3-319-23603-2\_3
- Dunker, A. K. (1982). A proton motive force transducer and its role in proton pumps, proton engines, tobacco mosaic virus assembly and hemoglobin allosterism. *J Theor Biol*, 97(1), 95-127.
- Erhardt, H., Steimle, S., Muders, V., Pohl, T., Walter, J., & Friedrich, T. (2012). Disruption of individual nuo-genes leads to the formation of partially assembled NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, 1817(6), 863-871. doi: 10.1016/j.bbabi.2011.10.008
- Erickson, J. W., & Gross, C. A. (1989). Identification of the sigma E subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: a second alternate sigma factor involved in high-temperature gene expression. *Genes Dev*, 3(9), 1462-1471.

- Evans, K. L., Kannan, S., Li, G., de Pedro, M. A., & Young, K. D. (2013). Eliminating a set of four penicillin binding proteins triggers the Rcs phosphorelay and Cpx stress responses in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 195(19), 4415-4424. doi: 10.1128/JB.00596-13
- Ezraty, B., Gennaris, A., Barras, F., & Collet, J. F. (2017). Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 15(7), 385-396. doi: 10.1038/nrmicro.2017.26
- Facey, S. J., & Kuhn, A. (2010). Biogenesis of bacterial inner-membrane proteins. *Cell Mol Life Sci*, 67(14), 2343-2362. doi: 10.1007/s00018-010-0303-0
- Fairman, J. W., Noinaj, N., & Buchanan, S. K. (2011). The structural biology of beta-barrel membrane proteins: a summary of recent reports. *Curr Opin Struct Biol*, 21(4), 523-531. doi: 10.1016/j.sbi.2011.05.005
- Ferbitz, L., Maier, T., Patzelt, H., Bukau, B., Deuerling, E., & Ban, N. (2004). Trigger factor in complex with the ribosome forms a molecular cradle for nascent proteins. *Nature*, 431(7008), 590-596. doi: 10.1038/nature02899
- Finn, R. D., Tate, J., Mistry, J., Coggill, P. C., Sammut, S. J., Hotz, H. R., . . . Bateman, A. (2008). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res*, 36(Database issue), D281-288. doi: 10.1093/nar/gkm960
- Fleming, P. J., Patel, D. S., Wu, E. L., Qi, Y., Yeom, M. S., Sousa, M. C., . . . Im, W. (2016). BamA POTRA Domain Interacts with a Native Lipid Membrane Surface. *Biophys J*, 110(12), 2698-2709. doi: 10.1016/j.bpj.2016.05.010
- Freinkman, E., Chng, S. S., & Kahne, D. (2011). The complex that inserts lipopolysaccharide into the bacterial outer membrane forms a two-protein plug-and-barrel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(6), 2486-2491. doi: 10.1073/pnas.1015617108
- Friedrich, T. (1998). The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, 1364(2), 134-146.
- Frirdich, E., & Gaynor, E. C. (2013). Peptidoglycan hydrolases, bacterial shape, and pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*, 16(6), 767-778. doi: 10.1016/j.mib.2013.09.005
- Gardel, C., Benson, S., Hunt, J., Michaelis, S., & Beckwith, J. (1987). secD, a new gene involved in protein export in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 169(3), 1286-1290.
- Gardel, C., Johnson, K., Jacq, A., & Beckwith, J. (1990). The secD locus of *E. coli* codes for two membrane proteins required for protein export. *EMBO J*, 9(10), 3209-3216.

- Ghosh, A. S., Chowdhury, C., & Nelson, D. E. (2008). Physiological functions of D-alanine carboxypeptidases in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol*, 16(7), 309-317. doi: 10.1016/j.tim.2008.04.006
- Glauner, B., Holtje, J. V., & Schwarz, U. (1988). The composition of the murein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 263(21), 10088-10095.
- Goemans, C., Denoncin, K., & Collet, J. F. (2014). Folding mechanisms of periplasmic proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1843(8), 1517-1528. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.10.014
- Goodell, E. W. (1985). Recycling of murein by *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 163(1), 305-310.
- Goodell, E. W., & Schwarz, U. (1985). Release of cell wall peptides into culture medium by exponentially growing *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 162(1), 391-397.
- Goosens, V. J., Monteferrante, C. G., & van Dijl, J. M. (2014). The Tat system of Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta*, 1843(8), 1698-1706. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.10.008
- Grabowicz, M., & Silhavy, T. J. (2017). Envelope Stress Responses: An Interconnected Safety Net. *Trends Biochem Sci*, 42(3), 232-242. doi: 10.1016/j.tibs.2016.10.002
- Guest, R. L., Wang, J., Wong, J. L., & Raivio, T. L. (2017). A Bacterial Stress Response Regulates Respiratory Protein Complexes To Control Envelope Stress Adaptation. *J Bacteriol*, 199(20). doi: 10.1128/JB.00153-17
- Guillier, M., & Gottesman, S. (2006). Remodelling of the *Escherichia coli* outer membrane by two small regulatory RNAs. *Mol Microbiol*, 59(1), 231-247. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04929.x
- Gunsalus, R. P. (1992). Control of electron flow in *Escherichia coli*: coordinated transcription of respiratory pathway genes. *J Bacteriol*, 174(22), 7069-7074.
- Guthrie, C., Nashimoto, H., & Nomura, M. (1969). Structure and function of *E. coli* ribosomes. 8. Cold-sensitive mutants defective in ribosome assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 63(2), 384-391.
- Heidrich, C., Templin, M. F., Ursinus, A., Merdanovic, M., Berger, J., Schwarz, H., . . . Holtje, J. V. (2001). Involvement of N-acetylmuramyl-L-alanine amidases in cell separation and antibiotic-induced autolysis of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 41(1), 167-178.

- Heidrich, C., Ursinus, A., Berger, J., Schwarz, H., & Holtje, J. V. (2002). Effects of multiple deletions of murein hydrolases on viability, septum cleavage, and sensitivity to large toxic molecules in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 184(22), 6093-6099.
- Helbig, S., Patzer, S. I., Schiene-Fischer, C., Zeth, K., & Braun, V. (2011). Activation of colicin M by the FkpA prolyl cis-trans isomerase/chaperone. *J Biol Chem*, 286(8), 6280-6290. doi: 10.1074/jbc.M110.165274
- Heras, B., Edeling, M. A., Schirra, H. J., Raina, S., & Martin, J. L. (2004). Crystal structures of the DsbG disulfide isomerase reveal an unstable disulfide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(24), 8876-8881. doi: 10.1073/pnas.0402769101
- Hinchliffe, S. J., Howard, S. L., Huang, Y. H., Clarke, D. J., & Wren, B. W. (2008). The importance of the Rcs phosphorelay in the survival and pathogenesis of the enteropathogenic yersinia. *Microbiology*, 154(Pt 4), 1117-1131. doi: 10.1099/mic.0.2007/012534-0
- Hirakawa, H., Nishino, K., Yamada, J., Hirata, T., & Yamaguchi, A. (2003). Beta-lactam resistance modulated by the overexpression of response regulators of two-component signal transduction systems in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*, 52(4), 576-582. doi: 10.1093/jac/dkg406
- Holst, O. (2007). The structures of core regions from enterobacterial lipopolysaccharides - an update. *FEMS Microbiol Lett*, 271(1), 3-11. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00708.x
- Holtje, J. V. (1996). Molecular interplay of murein synthases and murein hydrolases in *Escherichia coli*. *Microb Drug Resist*, 2(1), 99-103.
- Holtje, J. V., Mirelman, D., Sharon, N., & Schwarz, U. (1975). Novel type of murein transglycosylase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 124(3), 1067-1076.
- Hu, P., Janga, S. C., Babu, M., Diaz-Mejia, J. J., Butland, G., Yang, W., . . . Emili, A. (2009). Global functional atlas of *Escherichia coli* encompassing previously uncharacterized proteins. *PLoS Biol*, 7(4), e96. doi: 10.1371/journal.pbio.1000096
- Huang, K. C., Mukhopadhyay, R., Wen, B., Gitai, Z., & Wingreen, N. S. (2008). Cell shape and cell-wall organization in Gram-negative bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(49), 19282-19287. doi: 10.1073/pnas.0805309105
- Imlay, J. A. (2003). Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol*, 57, 395-418. doi: 10.1146/annurev.micro.57.030502.090938

- Imlay, J. A. (2013). The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nat Rev Microbiol*, 11(7), 443-454. doi: 10.1038/nrmicro3032
- Imlay, J. A., & Fridovich, I. (1991). Assay of metabolic superoxide production in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 266(11), 6957-6965.
- Inoue, A., Murata, Y., Takahashi, H., Tsuji, N., Fujisaki, S., & Kato, J. (2008). Involvement of an essential gene, mviN, in murein synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 190(21), 7298-7301. doi: 10.1128/JB.00551-08
- Ionescu, M., & Belkin, S. (2009). Overproduction of exopolysaccharides by an *Escherichia coli* K-12 rpoS mutant in response to osmotic stress. *Appl Environ Microbiol*, 75(2), 483-492. doi: 10.1128/AEM.01616-08
- Jarchow, S., Luck, C., Gorg, A., & Skerra, A. (2008). Identification of potential substrate proteins for the periplasmic *Escherichia coli* chaperone Skp. *Proteomics*, 8(23-24), 4987-4994. doi: 10.1002/pmic.200800288
- Johansen, J., Rasmussen, A. A., Overgaard, M., & Valentin-Hansen, P. (2006). Conserved small non-coding RNAs that belong to the sigmaE regulon: role in down-regulation of outer membrane proteins. *J Mol Biol*, 364(1), 1-8. doi: 10.1016/j.jmb.2006.09.004
- Jones, C. H., Danese, P. N., Pinkner, J. S., Silhavy, T. J., & Hultgren, S. J. (1997). The chaperone-assisted membrane release and folding pathway is sensed by two signal transduction systems. *EMBO J*, 16(21), 6394-6406. doi: 10.1093/emboj/16.21.6394
- Kadokura, H., & Beckwith, J. (2010). Mechanisms of oxidative protein folding in the bacterial cell envelope. *Antioxid Redox Signal*, 13(8), 1231-1246. doi: 10.1089/ars.2010.3187
- Kato, J., Suzuki, H., & Hirota, Y. (1985). Dispensability of either penicillin-binding protein-1a or -1b involved in the essential process for cell elongation in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*, 200(2), 272-277.
- King, G., & Sharom, F. J. (2012). Proteins that bind and move lipids: MsbA and NPC1. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 47(1), 75-95. doi: 10.3109/10409238.2011.636505
- Kirthi, N., Roy-Chaudhuri, B., Kelley, T., & Culver, G. M. (2006). A novel single amino acid change in small subunit ribosomal protein S5 has profound effects on translational fidelity. *RNA*, 12(12), 2080-2091. doi: 10.1261/rna.302006

- Kleerebezem, M., Heutink, M., & Tommassen, J. (1995). Characterization of an *Escherichia coli* rotA mutant, affected in periplasmic peptidyl-prolyl cis/trans isomerase. *Mol Microbiol*, 18(2), 313-320.
- Komar, J., Alvira, S., Schulze, R. J., Martin, R., Lycklama, A. N. J. A., Lee, S. C., . . . Collinson, I. (2016). Membrane protein insertion and assembly by the bacterial holo-translocon SecYEG-SecDF-YajC-YidC. *Biochem J*, 473(19), 3341-3354. doi: 10.1042/BCJ20160545
- Konovalova, A., Perlman, D. H., Cowles, C. E., & Silhavy, T. J. (2014). Transmembrane domain of surface-exposed outer membrane lipoprotein RcsF is threaded through the lumen of beta-barrel proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(41), E4350-4358. doi: 10.1073/pnas.1417138111
- Korshunov, S., & Imlay, J. A. (2006). Detection and quantification of superoxide formed within the periplasm of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 188(17), 6326-6334. doi: 10.1128/JB.00554-06
- Kouidmi, I., Levesque, R. C., & Paradis-Bleau, C. (2014). The biology of Mur ligases as an antibacterial target. *Mol Microbiol*, 94(2), 242-253. doi: 10.1111/mmi.12758
- Kraft, A. R., Templin, M. F., & Holtje, J. V. (1998). Membrane-bound lytic endotransglycosylase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 180(13), 3441-3447.
- Kritikos, G., Banzhaf, M., Herrera-Dominguez, L., Koumoutsaki, A., Wartel, M., Zietek, M., & Typas, A. (2017). A tool named Iris for versatile high-throughput phenotyping in microorganisms. *Nat Microbiol*, 2, 17014. doi: 10.1038/nmicrobiol.2017.14
- Krojer, T., Sawa, J., Schafer, E., Saibil, H. R., Ehrmann, M., & Clausen, T. (2008). Structural basis for the regulated protease and chaperone function of DegP. *Nature*, 453(7197), 885-890. doi: 10.1038/nature07004
- Landini, P., Egli, T., Wolf, J., & Lacour, S. (2014). sigmaS, a major player in the response to environmental stresses in *Escherichia coli*: role, regulation and mechanisms of promoter recognition. *Environ Microbiol Rep*, 6(1), 1-13. doi: 10.1111/1758-2229.12112
- Langsetmo, K., Fuchs, J., & Woodward, C. (1989). *Escherichia coli* thioredoxin folds into two compact forms of different stability to urea denaturation. *Biochemistry*, 28(8), 3211-3220.

- Laubacher, M. E., & Ades, S. E. (2008). The Rcs phosphorelay is a cell envelope stress response activated by peptidoglycan stress and contributes to intrinsic antibiotic resistance. *J Bacteriol*, 190(6), 2065-2074. doi: 10.1128/JB.01740-07
- Lautenbach, E., & Polk, R. E. (2007). Resistant gram-negative bacilli: A neglected healthcare crisis? *Am J Health Syst Pharm*, 64(23 Suppl 14), S3-21; quiz S22-24. doi: 10.2146/ajhp070477
- Leblanc, S. K., Oates, C. W., & Raivio, T. L. (2011). Characterization of the induction and cellular role of the BaeSR two-component envelope stress response of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 193(13), 3367-3375. doi: 10.1128/JB.01534-10
- Lecoq, L., Bougault, C., Hugonnet, J. E., Veckerle, C., Pessey, O., Arthur, M., & Simorre, J. P. (2012). Dynamics induced by beta-lactam antibiotics in the active site of *Bacillus subtilis* L,D-transpeptidase. *Structure*, 20(5), 850-861. doi: 10.1016/j.str.2012.03.015
- Lederberg, J. (1956). Bacterial Protoplasts Induced by Penicillin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 42(9), 574-577.
- Lee, L. J., Barrett, J. A., & Poole, R. K. (2005). Genome-wide transcriptional response of chemostat-cultured *Escherichia coli* to zinc. *J Bacteriol*, 187(3), 1124-1134. doi: 10.1128/JB.187.3.1124-1134.2005
- Lima, S., Guo, M. S., Chaba, R., Gross, C. A., & Sauer, R. T. (2013). Dual molecular signals mediate the bacterial response to outer-membrane stress. *Science*, 340(6134), 837-841. doi: 10.1126/science.1235358
- Liu, X., & Wang, C. C. (2001). Disulfide-dependent folding and export of *Escherichia coli* DsbC. *J Biol Chem*, 276(2), 1146-1151. doi: 10.1074/jbc.M004929200
- Lovering, A. L., Safadi, S. S., & Strynadka, N. C. (2012). Structural perspective of peptidoglycan biosynthesis and assembly. *Annu Rev Biochem*, 81, 451-478. doi: 10.1146/annurev-biochem-061809-112742
- Lupoli, T. J., Lebar, M. D., Markovski, M., Bernhardt, T., Kahne, D., & Walker, S. (2014). Lipoprotein activators stimulate *Escherichia coli* penicillin-binding proteins by different mechanisms. *J Am Chem Soc*, 136(1), 52-55. doi: 10.1021/ja410813j
- Macheboeuf, P., Contreras-Martel, C., Job, V., Dideberg, O., & Dessen, A. (2006). Penicillin binding proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. *FEMS Microbiol Rev*, 30(5), 673-691. doi: 10.1111/j.1574-6976.2006.00024.x

- Magnet, S., Bellais, S., Dubost, L., Fourgeaud, M., Mainardi, J. L., Petit-Frere, S., . . . Gutmann, L. (2007). Identification of the L,D-transpeptidases responsible for attachment of the Braun lipoprotein to *Escherichia coli* peptidoglycan. *J Bacteriol*, 189(10), 3927-3931. doi: 10.1128/JB.00084-07
- Maier, K. S., Hubich, S., Liebhart, H., Krauss, S., Kuhn, A., & Facey, S. J. (2008). An amphiphilic region in the cytoplasmic domain of KdpD is recognized by the signal recognition particle and targeted to the *Escherichia coli* membrane. *Mol Microbiol*, 68(6), 1471-1484. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06246.x
- Mainardi, J. L., Morel, V., Fourgeaud, M., Cremniter, J., Blanot, D., Legrand, R., . . . Gutmann, L. (2002). Balance between two transpeptidation mechanisms determines the expression of beta-lactam resistance in Enterococcus faecium. *J Biol Chem*, 277(39), 35801-35807. doi: 10.1074/jbc.M204319200
- Majdalani, N., & Gottesman, S. (2005). The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system. *Annu Rev Microbiol*, 59, 379-405. doi: 10.1146/annurev.micro.59.050405.101230
- Majdalani, N., Hernandez, D., & Gottesman, S. (2002). Regulation and mode of action of the second small RNA activator of RpoS translation, RprA. *Mol Microbiol*, 46(3), 813-826.
- Mandrup, S., Sorensen, R. V., Helledie, T., Nohr, J., Baldursson, T., Gram, C., . . . Kristiansen, K. (1998). Inhibition of 3T3-L1 adipocyte differentiation by expression of acyl-CoA-binding protein antisense RNA. *J Biol Chem*, 273(37), 23897-23903.
- Markiewicz, Z. (1989). Structure and functions of the periplasmic space. *Acta Microbiol Pol*, 38(3-4), 199-206.
- Messens, J., & Collet, J. F. (2006). Pathways of disulfide bond formation in *Escherichia coli*. *Int J Biochem Cell Biol*, 38(7), 1050-1062. doi: 10.1016/j.biocel.2005.12.011
- Mileykovskaya, E., & Dowhan, W. (1997). The Cpx two-component signal transduction pathway is activated in *Escherichia coli* mutant strains lacking phosphatidylethanolamine. *J Bacteriol*, 179(4), 1029-1034.
- Miot, M., & Betton, J. M. (2004). Protein quality control in the bacterial periplasm. *Microb Cell Fact*, 3(1), 4. doi: 10.1186/1475-2859-3-4

- Misra, R., CastilloKeller, M., & Deng, M. (2000). Overexpression of protease-deficient DegP(S210A) rescues the lethal phenotype of *Escherichia coli* OmpF assembly mutants in a degP background. *J Bacteriol*, 182(17), 4882-4888.
- Missiakas, D., Betton, J. M., & Raina, S. (1996). New components of protein folding in extracytoplasmic compartments of *Escherichia coli* SurA, FkpA and Skp/OmpH. *Mol Microbiol*, 21(4), 871-884.
- Missiakas, D., Georgopoulos, C., & Raina, S. (1993). Identification and characterization of the *Escherichia coli* gene dsbB, whose product is involved in the formation of disulfide bonds in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(15), 7084-7088.
- Muller, R., Kissling, W., & Kockott, G. (2000). ["More is less": a retrospective study of haloperidol dosages in acute schizophrenia]. *Psychiatr Prax*, 27(2), 69-73.
- Nakamura, H., Saiki, K., Mogi, T., & Anraku, Y. (1997). Assignment and functional roles of the cyoABCDE gene products required for the *Escherichia coli* bo-type quinol oxidase. *J Biochem*, 122(2), 415-421.
- Narita, S., & Tokuda, H. (2010). Sorting of bacterial lipoproteins to the outer membrane by the Lol system. *Methods Mol Biol*, 619, 117-129. doi: 10.1007/978-1-60327-412-8\_7
- Natale, P., Bruser, T., & Driessens, A. J. (2008). Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane--distinct translocases and mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 1778(9), 1735-1756. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.07.015
- Neidhardt, F. C., VanBogelen, R. A., & Vaughn, V. (1984). The genetics and regulation of heat-shock proteins. *Annu Rev Genet*, 18, 295-329. doi: 10.1146/annurev.ge.18.120184.001455
- Nishino, K., Honda, T., & Yamaguchi, A. (2005). Genome-wide analyses of *Escherichia coli* gene expression responsive to the BaeSR two-component regulatory system. *J Bacteriol*, 187(5), 1763-1772. doi: 10.1128/JB.187.5.1763-1772.2005
- Noinaj, N., Kuszak, A. J., Balusek, C., Gumbart, J. C., & Buchanan, S. K. (2014). Lateral opening and exit pore formation are required for BamA function. *Structure*, 22(7), 1055-1062. doi: 10.1016/j.str.2014.05.008
- Nouwen, N., & Driessens, A. J. (2002). SecDFyajC forms a heterotetrameric complex with YidC. *Mol Microbiol*, 44(5), 1397-1405.

- Nouwen, N., & Driessen, A. J. (2005). Inactivation of protein translocation by cold-sensitive mutations in the *yajC-secDF* operon. *J Bacteriol*, 187(19), 6852-6855. doi: 10.1128/JB.187.19.6852-6855.2005
- Okuda, S., Freinkman, E., & Kahne, D. (2012). Cytoplasmic ATP hydrolysis powers transport of lipopolysaccharide across the periplasm in *E. coli*. *Science*, 338(6111), 1214-1217. doi: 10.1126/science.1228984
- Oshima, T., Aiba, H., Masuda, Y., Kanaya, S., Sugiura, M., Wanner, B. L., . . . Mizuno, T. (2002). Transcriptome analysis of all two-component regulatory system mutants of *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol*, 46(1), 281-291.
- Palmer, T., & Berks, B. C. (2012). The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. *Nat Rev Microbiol*, 10(7), 483-496. doi: 10.1038/nrmicro2814
- Paradis-Bleau, C., Kritikos, G., Orlova, K., Typas, A., & Bernhardt, T. G. (2014). A genome-wide screen for bacterial envelope biogenesis mutants identifies a novel factor involved in cell wall precursor metabolism. *PLoS Genet*, 10(1), e1004056. doi: 10.1371/journal.pgen.1004056
- Paradis-Bleau, C., Markovski, M., Uehara, T., Lupoli, T. J., Walker, S., Kahne, D. E., & Bernhardt, T. G. (2010). Lipoprotein cofactors located in the outer membrane activate bacterial cell wall polymerases. *Cell*, 143(7), 1110-1120. doi: 10.1016/j.cell.2010.11.037
- Park, H., Saha, S. K., & Inouye, M. (1998). Two-domain reconstitution of a functional protein histidine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(12), 6728-6732.
- Paulsen, C. E., & Carroll, K. S. (2013). Cysteine-mediated redox signaling: chemistry, biology, and tools for discovery. *Chem Rev*, 113(7), 4633-4679. doi: 10.1021/cr300163e
- Peano, C., Wolf, J., Demol, J., Rossi, E., Petiti, L., De Bellis, G., . . . Landini, P. (2015). Characterization of the *Escherichia coli* sigma(S) core regulon by Chromatin Immunoprecipitation-sequencing (ChIP-seq) analysis. *Sci Rep*, 5, 10469. doi: 10.1038/srep10469
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, 25(13), 1605-1612. doi: 10.1002/jcc.20084

- Pisabarro, A. G., de Pedro, M. A., & Vazquez, D. (1985). Structural modifications in the peptidoglycan of *Escherichia coli* associated with changes in the state of growth of the culture. *J Bacteriol*, 161(1), 238-242.
- Plate, C. A., & Suit, J. L. (1981). The eup genetic locus of *Escherichia coli* and its role in H+/solute symport. *J Biol Chem*, 256(24), 12974-12980.
- Pogliano, J. A., & Beckwith, J. (1994). SecD and SecF facilitate protein export in *Escherichia coli*. *EMBO J*, 13(3), 554-561.
- Pogliano, K. J., & Beckwith, J. (1993). The Cs sec mutants of *Escherichia coli* reflect the cold sensitivity of protein export itself. *Genetics*, 133(4), 763-773.
- Polissi, A., & Sperandeo, P. (2014). The lipopolysaccharide export pathway in *Escherichia coli*: structure, organization and regulated assembly of the Lpt machinery. *Mar Drugs*, 12(2), 1023-1042. doi: 10.3390/md12021023
- Popescu, A., & Doyle, R. J. (1996). The Gram stain after more than a century. *Biotech Histochem*, 71(3), 145-151.
- Prats, R., & de Pedro, M. A. (1989). Normal growth and division of *Escherichia coli* with a reduced amount of murein. *J Bacteriol*, 171(7), 3740-3745.
- Prigent-Combaret, C., Brombacher, E., Vidal, O., Ambert, A., Lejeune, P., Landini, P., & Dorel, C. (2001). Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli* via regulation of the csgD gene. *J Bacteriol*, 183(24), 7213-7223. doi: 10.1128/JB.183.24.7213-7223.2001
- Quan, S., Koldewey, P., Tapley, T., Kirsch, N., Ruane, K. M., Pfizenmaier, J., . . . Bardwell, J. C. (2011). Genetic selection designed to stabilize proteins uncovers a chaperone called Spy. *Nat Struct Mol Biol*, 18(3), 262-269. doi: 10.1038/nsmb.2016
- Raivio, T. L. (2005). Envelope stress responses and Gram-negative bacterial pathogenesis. *Mol Microbiol*, 56(5), 1119-1128. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04625.x
- Raivio, T. L. (2014). Everything old is new again: an update on current research on the Cpx envelope stress response. *Biochim Biophys Acta*, 1843(8), 1529-1541. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.10.018
- Raivio, T. L., Leblanc, S. K., & Price, N. L. (2013). The *Escherichia coli* Cpx envelope stress response regulates genes of diverse function that impact antibiotic resistance and membrane integrity. *J Bacteriol*, 195(12), 2755-2767. doi: 10.1128/JB.00105-13

- Raivio, T. L., & Silhavy, T. J. (1997). Transduction of envelope stress in *Escherichia coli* by the Cpx two-component system. *J Bacteriol*, 179(24), 7724-7733.
- Raivio, T. L., & Silhavy, T. J. (1999). The sigmaE and Cpx regulatory pathways: overlapping but distinct envelope stress responses. *Curr Opin Microbiol*, 2(2), 159-165. doi: 10.1016/S1369-5274(99)80028-9
- Raivio, T. L., & Silhavy, T. J. (2001). Periplasmic stress and ECF sigma factors. *Annu Rev Microbiol*, 55, 591-624. doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.591
- Ramos, H. C., Rumbo, M., & Sirard, J. C. (2004). Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiol*, 12(11), 509-517. doi: 10.1016/j.tim.2004.09.002
- Reddie, K. G., & Carroll, K. S. (2008). Expanding the functional diversity of proteins through cysteine oxidation. *Curr Opin Chem Biol*, 12(6), 746-754. doi: 10.1016/j.cbpa.2008.07.028
- Ricci, D. P., & Silhavy, T. J. (2012). The Bam machine: a molecular cooper. *Biochim Biophys Acta*, 1818(4), 1067-1084. doi: 10.1016/j.bbamem.2011.08.020
- Rida, S., Caillet, J., & Alix, J. H. (1996). Amplification of a novel gene, sanA, abolishes a vancomycin-sensitive defect in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 178(1), 94-102.
- Rizzitello, A. E., Harper, J. R., & Silhavy, T. J. (2001). Genetic evidence for parallel pathways of chaperone activity in the periplasm of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 183(23), 6794-6800. doi: 10.1128/JB.183.23.6794-6800.2001
- Rutherford, B. J., Dahl, R. H., Price, R. E., Szmidt, H. L., Benke, P. I., Mukhopadhyay, A., & Keasling, J. D. (2010). Functional genomic study of exogenous n-butanol stress in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 76(6), 1935-1945. doi: 10.1128/AEM.02323-09
- Saka, K., Tadenuma, M., Nakade, S., Tanaka, N., Sugawara, H., Nishikawa, K., . . . Nishimura, A. (2005). A complete set of *Escherichia coli* open reading frames in mobile plasmids facilitating genetic studies. *DNA Res*, 12(1), 63-68.
- Sankaran, K., & Wu, H. C. (1994). Lipid modification of bacterial prolipoprotein. Transfer of diacylglycerol moiety from phosphatidylglycerol. *J Biol Chem*, 269(31), 19701-19706.

- Sauvage, E., Derouaux, A., Fraipont, C., Joris, M., Herman, R., Rocaboy, M., . . . Charlier, P. (2014). Crystal structure of penicillin-binding protein 3 (PBP3) from *Escherichia coli*. *PLoS One*, 9(5), e98042. doi: 10.1371/journal.pone.0098042
- Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J. A., & Charlier, P. (2008). The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev*, 32(2), 234-258. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00105.x
- Schiffer, G., & Holtje, J. V. (1999). Cloning and characterization of PBP 1C, a third member of the multimodular class A penicillin-binding proteins of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 274(45), 32031-32039.
- Scholz, C., Scherer, G., Mayr, L. M., Schindler, T., Fischer, G., & Schmid, F. X. (1998). Prolyl isomerasers do not catalyze isomerization of non-prolyl peptide bonds. *Biol Chem*, 379(3), 361-365.
- Schulz, G. E. (2002). The structure of bacterial outer membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1565(2), 308-317.
- Seaver, L. C., & Imlay, J. A. (2001). Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 183(24), 7173-7181. doi: 10.1128/JB.183.24.7173-7181.2001
- Seaver, L. C., & Imlay, J. A. (2004). Are respiratory enzymes the primary sources of intracellular hydrogen peroxide? *J Biol Chem*, 279(47), 48742-48750. doi: 10.1074/jbc.M408754200
- Sham, L. T., Butler, E. K., Lebar, M. D., Kahne, D., Bernhardt, T. G., & Ruiz, N. (2014). Bacterial cell wall. MurJ is the flippase of lipid-linked precursors for peptidoglycan biogenesis. *Science*, 345(6193), 220-222. doi: 10.1126/science.1254522
- Shao, F., Bader, M. W., Jakob, U., & Bardwell, J. C. (2000). DsbG, a protein disulfide isomerase with chaperone activity. *J Biol Chem*, 275(18), 13349-13352.
- Shimohata, N., Nagamori, S., Akiyama, Y., Kaback, H. R., & Ito, K. (2007). SecY alterations that impair membrane protein folding and generate a membrane stress. *J Cell Biol*, 176(3), 307-317. doi: 10.1083/jcb.200611121
- Shin, S., & Park, C. (1995). Modulation of flagellar expression in *Escherichia coli* by acetyl phosphate and the osmoregulator OmpR. *J Bacteriol*, 177(16), 4696-4702.

- Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(5), a000414. doi: 10.1101/cshperspect.a000414
- Sklar, J. G., Wu, T., Kahne, D., & Silhavy, T. J. (2007). Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in *Escherichia coli*. *Genes Dev*, 21(19), 2473-2484. doi: 10.1101/gad.1581007
- Slama, T. G. (2008). Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. *Crit Care*, 12 Suppl 4, S4. doi: 10.1186/cc6820
- Slamti, L., & Waldor, M. K. (2009). Genetic analysis of activation of the *Vibrio cholerae* Cpx pathway. *J Bacteriol*, 191(16), 5044-5056. doi: 10.1128/JB.00406-09
- Sledjeski, D. D., & Gottesman, S. (1996). Osmotic shock induction of capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 178(4), 1204-1206.
- Snyder, W. B., Davis, L. J., Danese, P. N., Cosma, C. L., & Silhavy, T. J. (1995). Overproduction of NlpE, a new outer membrane lipoprotein, suppresses the toxicity of periplasmic LacZ by activation of the Cpx signal transduction pathway. *J Bacteriol*, 177(15), 4216-4223.
- Sobiecka-Szkatula, A., Polit, A., Scire, A., Gieldon, A., Tanfani, F., Szkarlat, Z., . . . Lipinska, B. (2009). Temperature-induced conformational changes within the regulatory loops L1-L2-LA of the HtrA heat-shock protease from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, 1794(11), 1573-1582. doi: 10.1016/j.bbapap.2009.07.002
- Spiess, C., Beil, A., & Ehrmann, M. (1999). A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell*, 97(3), 339-347.
- Spratt, B. G. (1975). Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K12. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72(8), 2999-3003.
- Srivastava, S. K., Lambadi, P. R., Ghosh, T., Pathania, R., & Navani, N. K. (2014). Genetic regulation of spy gene expression in *Escherichia coli* in the presence of protein unfolding agent ethanol. *Gene*, 548(1), 142-148. doi: 10.1016/j.gene.2014.07.003
- Stanley, N. R., Findlay, K., Berks, B. C., & Palmer, T. (2001). *Escherichia coli* strains blocked in Tat-dependent protein export exhibit pleiotropic defects in the cell envelope. *J Bacteriol*, 183(1), 139-144. doi: 10.1128/JB.183.1.139-144.2001
- Stock, A. M., Robinson, V. L., & Goudreau, P. N. (2000). Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 69, 183-215. doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.183

- Strauch, K. L., Johnson, K., & Beckwith, J. (1989). Characterization of degP, a gene required for proteolysis in the cell envelope and essential for growth of *Escherichia coli* at high temperature. *J Bacteriol*, 171(5), 2689-2696.
- Sugai, R., Shimizu, H., Nishiyama, K., & Tokuda, H. (2001). Overexpression of yccL (gnsA) and ydfY (gnsB) increases levels of unsaturated fatty acids and suppresses both the temperature-sensitive fabA6 mutation and cold-sensitive secG null mutation of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 183(19), 5523-5528. doi: 10.1128/JB.183.19.5523-5528.2001
- Tao, K., Narita, S., & Tokuda, H. (2012). Defective lipoprotein sorting induces lolA expression through the Rcs stress response phosphorelay system. *J Bacteriol*, 194(14), 3643-3650. doi: 10.1128/JB.00553-12
- Thomas, J. W., Puustinen, A., Alben, J. O., Gennis, R. B., & Wikstrom, M. (1993). Substitution of asparagine for aspartate-135 in subunit I of the cytochrome bo ubiquinol oxidase of *Escherichia coli* eliminates proton-pumping activity. *Biochemistry*, 32(40), 10923-10928.
- Thunnissen, A. M., Rozeboom, H. J., Kalk, K. H., & Dijkstra, B. W. (1995). Structure of the 70-kDa soluble lytic transglycosylase complexed with bulgecin A. Implications for the enzymatic mechanism. *Biochemistry*, 34(39), 12729-12737.
- Tomasz, A. (1979). The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillins: how the beta-lactam antibiotics kill and lyse bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 33, 113-137. doi: 10.1146/annurev.mi.33.100179.000553
- Touati, D. (2000). Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch Biochem Biophys*, 373(1), 1-6. doi: 10.1006/abbi.1999.1518
- Tran, Q. H., Bongaerts, J., Vlad, D., & Unden, G. (1997). Requirement for the proton-pumping NADH dehydrogenase I of *Escherichia coli* in respiration of NADH to fumarate and its bioenergetic implications. *Eur J Biochem*, 244(1), 155-160.
- Tsukazaki, T., Mori, H., Echizen, Y., Ishitani, R., Fukai, S., Tanaka, T., . . . Nureki, O. (2011). Structure and function of a membrane component SecDF that enhances protein export. *Nature*, 474(7350), 235-238. doi: 10.1038/nature09980

- Typas, A., Banzhaf, M., van den Berg van Saparoea, B., Verheul, J., Biboy, J., Nichols, R. J., . . . Vollmer, W. (2010). Regulation of peptidoglycan synthesis by outer-membrane proteins. *Cell*, 143(7), 1097-1109. doi: 10.1016/j.cell.2010.11.038
- van Heijenoort, J. (2001). Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan monomer unit. *Nat Prod Rep*, 18(5), 503-519.
- Vertommen, D., Ruiz, N., Leverrier, P., Silhavy, T. J., & Collet, J. F. (2009). Characterization of the role of the *Escherichia coli* periplasmic chaperone SurA using differential proteomics. *Proteomics*, 9(9), 2432-2443. doi: 10.1002/pmic.200800794
- Vollmer, W., & Bertsche, U. (2008). Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, 1778(9), 1714-1734. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.06.007
- Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P., & Foster, S. (2008). Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol Rev*, 32(2), 259-286. doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00099.x
- Wang, P., Kuhn, A., & Dalbey, R. E. (2010). Global change of gene expression and cell physiology in YidC-depleted *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 192(8), 2193-2209. doi: 10.1128/JB.00484-09
- Weiner, J. H., & Li, L. (2008). Proteome of the *Escherichia coli* envelope and technological challenges in membrane proteome analysis. *Biochim Biophys Acta*, 1778(9), 1698-1713. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.07.020
- Wientjes, F. B., Pas, E., Taschner, P. E., & Woldringh, C. L. (1985). Kinetics of uptake and incorporation of meso-diaminopimelic acid in different *Escherichia coli* strains. *J Bacteriol*, 164(1), 331-337.
- Xu, G., & Chance, M. R. (2007). Hydroxyl radical-mediated modification of proteins as probes for structural proteomics. *Chem Rev*, 107(8), 3514-3543. doi: 10.1021/cr0682047
- Yamamoto, K., & Ishihama, A. (2006). Characterization of copper-inducible promoters regulated by CpxA/CpxR in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 70(7), 1688-1695. doi: 10.1271/bbb.60024
- Yamamoto, K., Ogasawara, H., & Ishihama, A. (2008). Involvement of multiple transcription factors for metal-induced spy gene expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 133(2), 196-200. doi: 10.1016/j.jbiotec.2007.08.002

- Zapun, A., Missiakas, D., Raina, S., & Creighton, T. E. (1995). Structural and functional characterization of DsbC, a protein involved in disulfide bond formation in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 34(15), 5075-5089.
- Zhang, Y. M., & Rock, C. O. (2008). Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 6(3), 222-233. doi: 10.1038/nrmicro1839
- Zhou, X., Keller, R., Volkmer, R., Krauss, N., Scheerer, P., & Hunke, S. (2011). Structural basis for two-component system inhibition and pilus sensing by the auxiliary CpxP protein. *J Biol Chem*, 286(11), 9805-9814. doi: 10.1074/jbc.M110.194092

## **ANNEXE I : Article publié non discuté dans cette thèse**

Durant cette thèse, j'ai eu l'occasion de rédiger une revue de littérature qui n'est pas discutée dans cet ouvrage. Dans cet article, nous avons discuté le fait que les quatres Mur ligases, MurC, MurD, MurE et MurF présentent le même mécanisme catalytique et partagent des caractéristiques structurelles qui pourraient être exploitées pour le désigne d'inhibiteurs qui peuvent cibler les quatres Mur à la fois. Cet article a été soumis à un processus de révision par les pairs avant sa publication dans la revue « Molecular Microbiology ».

**Kouidmi, I.**, Levesque, R. C., Paradis-Bleau, C. 2014. The biology of Mur ligases as an antibacterial target. *Molecular Microbiology*, 94, 242-25

## MicroReview

# The biology of Mur ligases as an antibacterial target

Imène Kouidmi,<sup>1</sup> Roger C. Levesque<sup>2</sup> and Catherine Paradis-Bleau<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

<sup>2</sup>Institut de biologie intégrative et des systèmes, Université Laval, Montreal, Quebec, Canada.

### Summary

With antibiotic resistance mechanisms increasing in diversity and spreading among bacterial pathogens, the development of new classes of antibacterial agents against judiciously chosen targets is a high-priority task. The biochemical pathway for peptidoglycan biosynthesis is one of the best sources of antibacterial targets. Within this pathway are the Mur ligases, described in this review as highly suitable targets for the development of new classes of antibacterial agents. The amide ligases MurC, MurD, MurE and MurF function with the same catalytic mechanism and share conserved amino acid regions and structural features that can conceivably be exploited for the design of inhibitors that simultaneously target more than one enzyme. This would provide multi-target antibacterial weapons with minimized likelihood of target-mediated resistance development.

### Introduction

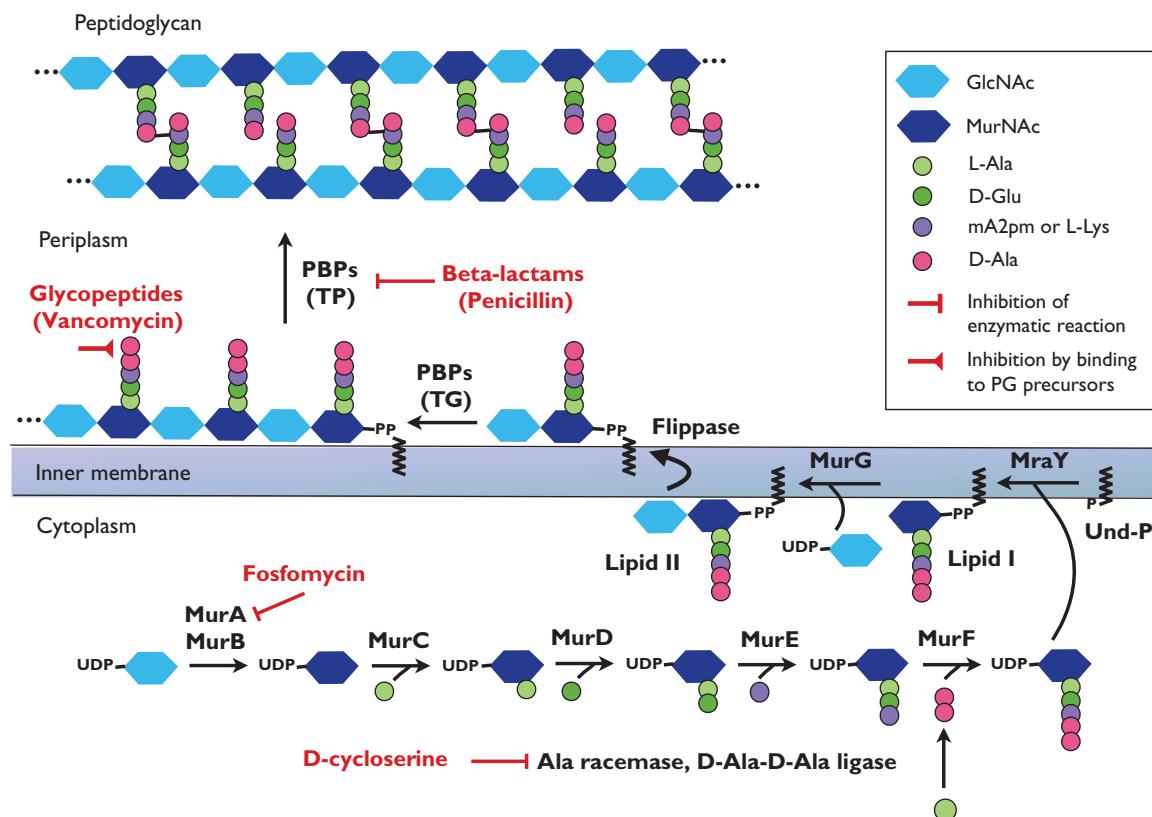
The alarming increase and spread of resistance mechanisms among emerging and re-emerging bacterial pathogens has become one of the most critical global public health problems; involving all bacterial pathogens and all clinically useful antibiotics, complicating the treatment of infectious diseases and increasing human morbidity, mortality and health care costs (Livermore, 2009; Davies and Davies, 2010; Fauci and Morens, 2012). The framework for antibiotic discovery, development and approval has been largely abandoned by the pharmaceutical industry

Accepted 14 August, 2014. \*For correspondence. E-mail Catherine.Paradis-Bleau@umontreal.ca; Tel. (+1) 514 343 5967; Fax (+1) 514 343 5701.

over the last four decades, and there have been no successful discoveries of novel antibacterial agents since 1987 (Silver, 2011). We now have a very limited arsenal of effective antibacterial drugs on the shelf and the development of new classes of antibacterial agents against judiciously chosen targets must be given top priority.

The biochemical machinery for peptidoglycan (PG) biosynthesis is an excellent source of antibacterial targets. The PG biosynthesis pathway can be divided in three topological steps detailed in Fig. 1. PG is composed of long glycan chains made of alternating units of *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) and *N*-acetylmuramic acid (MurNAc) cross-linked by short peptide bridges (Holtje, 1998). Both Gram-positive and Gram-negative bacteria have PG layers of similar composition, although the PG layer of Gram-positive bacteria is thicker and more cross-linked (Vollmer *et al.*, 2008). PG is essential for all free-living eubacteria. It provides the rigidity, flexibility and strength necessary for bacterial cells to grow and divide while withstanding their high internal osmotic pressure (Vollmer *et al.*, 2008; Typas *et al.*, 2012). Many clinically useful antibiotics, notably the beta-lactams (ex. penicillins), glycopeptides (ex. vancomycin), fosfomycin and cycloserine, interfere with steps within the PG biosynthesis pathway (Fig. 1), but no antibacterial agent targets the amide ligases.

The amide ligases MurC, MurD, MurE and MurF catalyse non-ribosomal peptide bond formations for the addition of the peptide moiety on the PG building blocks (Figs 1 and 2). These enzymes are excellent antibacterial targets because they are functionally essential for bacterial survival (Lugtenberg and v Schijndel-van Dam, 1972a,b; 1973; Lugtenberg *et al.*, 1972) and are conserved among all medically relevant bacteria with no counterpart in eukaryotic cells (Bouhss *et al.*, 1997; Eveland *et al.*, 1997; Walsh *et al.*, 1999; McCoy and Maurelli, 2005). The Mur ligases share conserved amino acid regions, structural features and a fully elucidated enzymatic mechanism amenable to high-throughput screening of natural products and small molecules, structure-based virtual screening and inhibitory investigations such as structure–activity relationship (Bouhss *et al.*, 1997; van Heijenoort, 2001; El Zeeby *et al.*, 2003; Smith, 2006). These similarities can



**Fig. 1.** Schematic representation of the cytoplasmic, membrane and periplasmic steps of the bacterial PG biosynthesis. In the cytoplasmic step, MurA and MurB first synthesize UDP-MurNAc from UDP-GlcNAc. The Mur ligase enzymes MurC, MurD, MurE and MurF then add the pentapeptide moiety to make the cytoplasmic PG precursor UDP-MurNAc-pentapeptide. In the membrane step of the pathway, MraY transfers the phospho-N-acetylglucosamyl-pentapeptide from UDP-MurNAc-pentapeptide to the lipid carrier undecaprenyl-P (Und-P) to form lipid I. MurG then adds GlcNAc from UDP-GlcNAc to lipid I, yielding lipid II. This membrane PG precursor is then flipped from the inner leaflet of the inner membrane to the outer leaflet, but the identity of the flippease remains controversial. PG assembly is performed by the transglycosylation (TG) and transpeptidation (TP) activities of the penicillin-binding proteins (PBPs) that polymerize lipid II units in long glycan strands composed of alternating units of GlcNAc and MurNAc cross-linked via short peptide chains. The sites of action of the commercial antibiotics targeting the pathway are indicated in red. m2pm, meso-diaminopimelic acid.

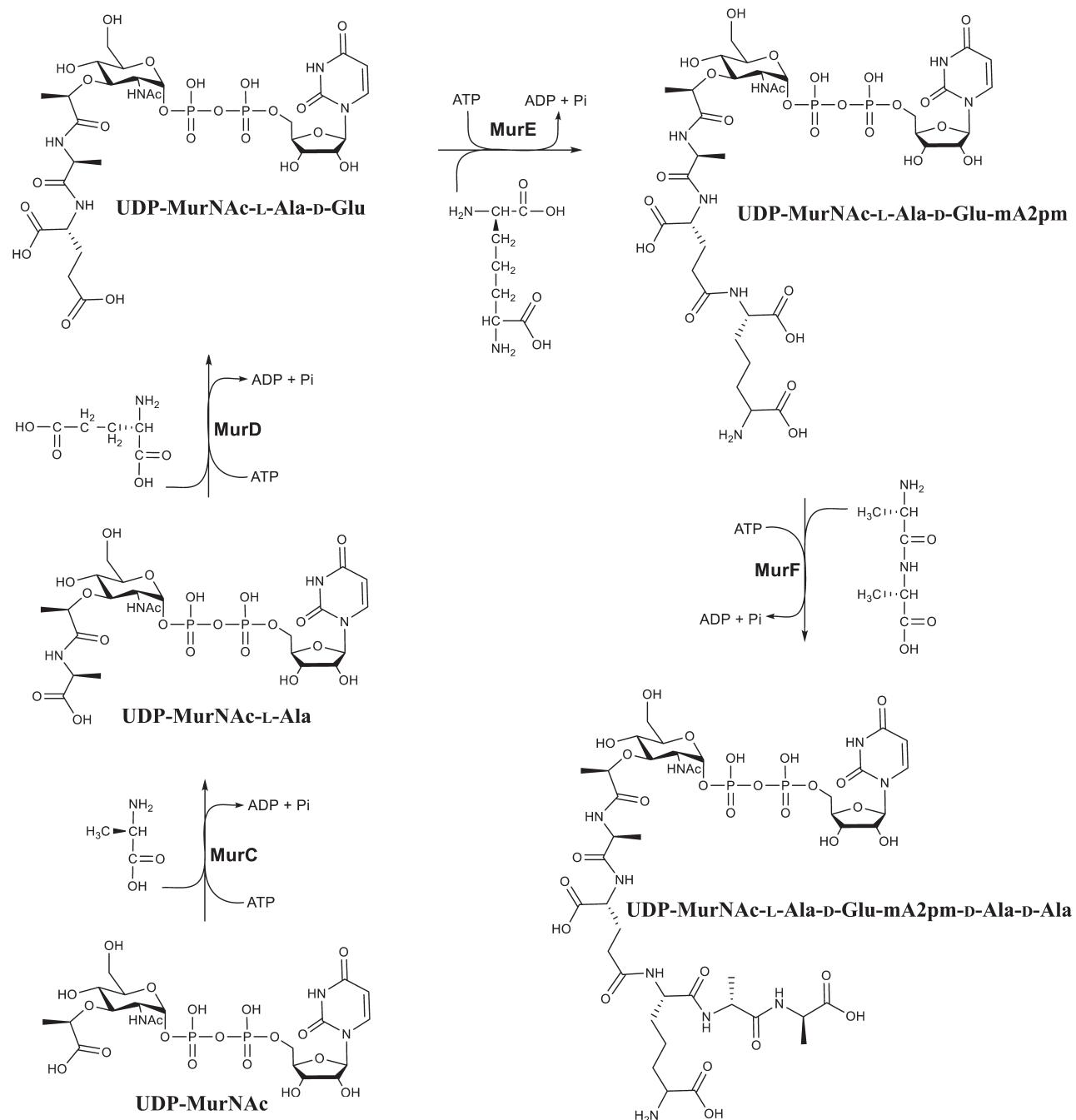
conceivably be exploited to design antibacterial agents targeting more than one enzyme simultaneously (Kotnik *et al.*, 2007a; Silver, 2011; East and Silver, 2013; Hrast *et al.*, 2014). This would yield to antibacterial agents with a reduced likelihood of target-mediated resistance development, since mutations conferring resistance would have to occur in many target genes in a single bacterial generation.

### The Mur ligases as individual targets

#### MurC

The biochemical pathway for PG biosynthesis starts with the conversion of UDP-GlcNAc available in the bacterial cytoplasm to UDP-MurNAc by the enolpyruvyl transferase MurA and flavin-dependent reductase MurB (Fig. 1). MurC then specifically adds the amino acid L-Ala to the nucleotide precursor, yielding UDP-MurNAc-L-Ala (Figs 1 and 2).

It has been shown that *Escherichia coli* MurC is in an equilibrium between monomeric and dimeric forms *in vitro* (Jin *et al.*, 1996). However, the dimerization of MurC does not seem to be important for the enzyme activity *in vitro* (Nosal *et al.*, 1998). The dimerization motif is conserved in about half of all known MurC protein sequences (Deva *et al.*, 2006), and is missing in MurC of spore-forming bacteria like Bacilli and Clostridia. The need for increased PG synthesis during sporulation (Daniel and Errington, 2003) may have selected a monomeric MurC that is potentially more active *in vivo* (Deva *et al.*, 2006). MurC activity is regulated in a phosphorylation-dependent manner in *Corynebacterium glutamicum* (Fiuza *et al.*, 2008) and *Streptococcus pneumoniae* (Falk and Weisblum, 2013). MurC of the obligate intracellular pathogens among the genus *Chlamydia* is of particular interest. Until quite recently, PG material could not be detected in *Chlamydia* even though they have PG biosynthesis genes and are



**Fig. 2.** Formation of the PG peptide moiety by the Mur ligases. MurC first catalyses the addition of L-Ala to the nucleotide substrate UDP-MurNAc, MurD ligates D-Glu to UDP-MurNAc-L-Ala, MurE adds the mA2pm residue in Gram-negative bacteria, bacilli and Mycobacteria (this residue is L-Lys in most Gram-positive bacteria) to form UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu-mA2pm, and MurF catalyses the addition of the terminal d-Ala-d-Ala dipeptide, yielding UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu-mA2pm-d-Ala-d-Ala.

susceptible to PG-targeting antibiotics, but a new PG labelling method revealed that they do possess a PG layer (Liechti *et al.*, 2014). These bacteria have the unusual bi-functional protein MurC-Ddl, displaying a typical MurC activity (Hesse *et al.*, 2003) and a D-Ala-D-Ala ligase (Ddl)

activity required for the synthesis of the d-Ala-d-Ala substrate of MurF (Figs 1 and 2). The Ddl activity of MurC-Ddl has been shown to depend on the MurC domain (McCoy and Maurelli, 2005). Inhibitors of MurC may thus be able to inhibit both the MurC and Ddl enzymatic functions in

*Chlamydiaceae*. To date, none of the known MurC inhibitors have been tested against the *Chlamydia* MurC-Ddl enzyme.

#### MurD

MurD catalyses the formation of an amide bond between D-Glu and UDP-MurNAc-L-Ala to form UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu (Figs 1 and 2). Amino acids with the D configuration are metabolized only in prokaryotes and constitute the most distinctive feature of the PG, presumably providing resistance to degradation by external enzymes (Bugg and Walsh, 1992). As MurD displays extremely high specificity for its D-amino acid substrate (Bertrand *et al.*, 1999; Walsh *et al.*, 1999; van Heijenoort, 2001), it has been identified as one of the most promising new targets for the discovery of selective antibacterial agents (Walsh *et al.*, 1999; Anishetty *et al.*, 2005). It has been suggested that the MurD reaction is the step at which PG synthesis is regulated to maintain the relative thickness of the PG layer in Gram-negative bacteria (Walsh *et al.*, 1999). Furthermore, *Mycobacterium tuberculosis* MurD is a substrate of PknA kinase, and transphosphorylation of MurD might be involved in the regulation of a switch between PG biosynthesis and cell division in mycobacteria (Thakur and Chakraborti, 2008).

#### MurE

The third residue of the PG peptide moiety is added by MurE (Figs 1 and 2), the only Mur ligase with a substrate specificity that varies among bacteria. Typically, Gram-negative bacteria, bacilli and Mycobacteria contain a meso-diaminopimelic acid (mA2pm) residue at the third position of the PG peptide moiety while Gram-positive bacteria contain a L-Lys residue. The incorporation of the correct species-specific amino acid substrate by MurE is critical as the third residue of the PG peptide moiety is involved in glycan strand cross-linkages and thus plays a key role in maintaining PG integrity. Indeed, addition of the incorrect amino acid at the third position of the PG peptide moiety can result in morphological changes and bacterial cell lysis (Mengin-Lecreux *et al.*, 1999; Consaul *et al.*, 2005). The specific tetrapeptide consensus sequence DNPR or D(D,N)P(N,A) in the amino acid-binding pockets of MurE assures the recognition of mA2pm or L-lys respectively (Boniface *et al.*, 2006). Recent structural work by Ruane and colleagues revealed that other regions of the *Staphylococcus aureus* MurE protein contain substrate-selecting residues important for the formation of the amino acid-binding pocket (Ruane *et al.*, 2013).

#### MurF

The fourth amide ligase typically adds the D-Ala-D-Ala dipeptide to UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu-(mA2pm/L-lys),

yielding the final cytoplasmic PG precursor UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu-(mA2pm/L-lys)-D-Ala-D-Ala (Smith, 2006) (Figs 1 and 2). The dipeptide added by MurF is crucial for PG assembly as its peptide bond energizes the reaction for glycan strand cross-linking in the periplasmic space where there is no ATP (Holtje, 1998; Silhavy *et al.*, 2010). MurF exclusively utilizes dipeptide substrates composed of D-amino acids (Bugg & Walsh, 1992) and accepts a broader range of substrates than the other Mur ligases (Anderson *et al.*, 1996). The most common acquired resistance mechanism against glycopeptide antibiotics involves the synthesis of the dipeptide D-Ala-D-Lac or D-Ala-D-Ser by the Van ligases, and its incorporation into the PG by MurF (van Heijenoort, 2001). MurF can also integrate non-canonical D-amino acids such as D-methionine into the PG. Non-canonical D-amino acids are produced in response to environmental stresses such as the entry into stationary phase, and they remodel PG composition and structure (Lam *et al.*, 2009; Cava *et al.*, 2011; Horcajo *et al.*, 2012). Interestingly, a clonal mutation identified in MurF from clinical isolates of *S. pneumoniae* renders PG synthesis dependent on environmental CO<sub>2</sub> levels and temperature, and might allow these isolates to rapidly adapt and colonize humans (Burghout *et al.*, 2013).

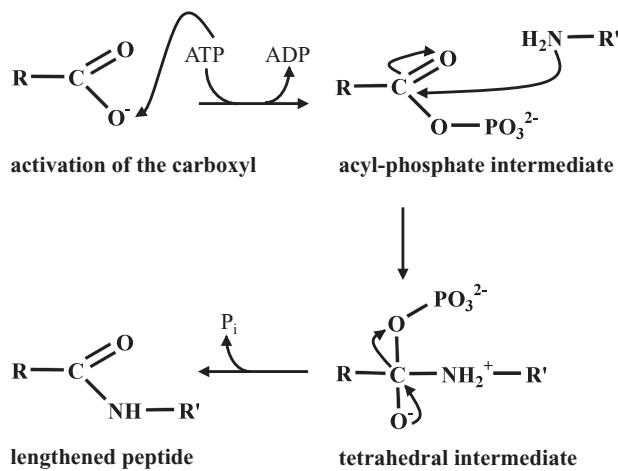
### Functional and structural similarities between the Mur ligases

#### Conserved amino acid regions

More than 20 years ago, it was determined that 10–20% of the primary sequence of the ATP-dependent ligases MurC, MurD, MurE and MurF is identical and that the enzymes share a highly similar ATP binding site (Bugg and Walsh, 1992). Further comparisons identified seven residues and the ATP-binding consensus sequence GXXGKT/S as common invariants in these proteins (Bouhss *et al.*, 1997). Four regions of homology critical for Mur ligase activity were subsequently described: region I includes the nucleotide fold, region II is an extended domain in the middle of the proteins containing the invariant Glu and His residues positioned between two acidic residues nested within a hydrophobic region, region III presents a short concentrated set of acidic residues conserved in the form of a dyad, and region IV is a hydrophobic patch (Eveland *et al.*, 1997). The Mur ligases were then defined as a group of closely related proteins presumably originating from a common ancestor (Bouhss *et al.*, 1997).

#### Common catalytic mechanism

The Mur ligases use the phosphate bond energy to catalyse the ligation of amino acids into a growing peptide chain



**Fig. 3.** Catalytic mechanism of the Mur ligase reaction including activation of the carboxyl group of UDP-MurNAc(-peptide) by transfer of the γ-phosphate of ATP, formation of the acyl-phosphate intermediate, nucleophilic attack by the amino group of the condensing amino acid, formation of the tetrahedral intermediate with the new peptide bond, and production of the lengthened peptide and P<sub>i</sub>.

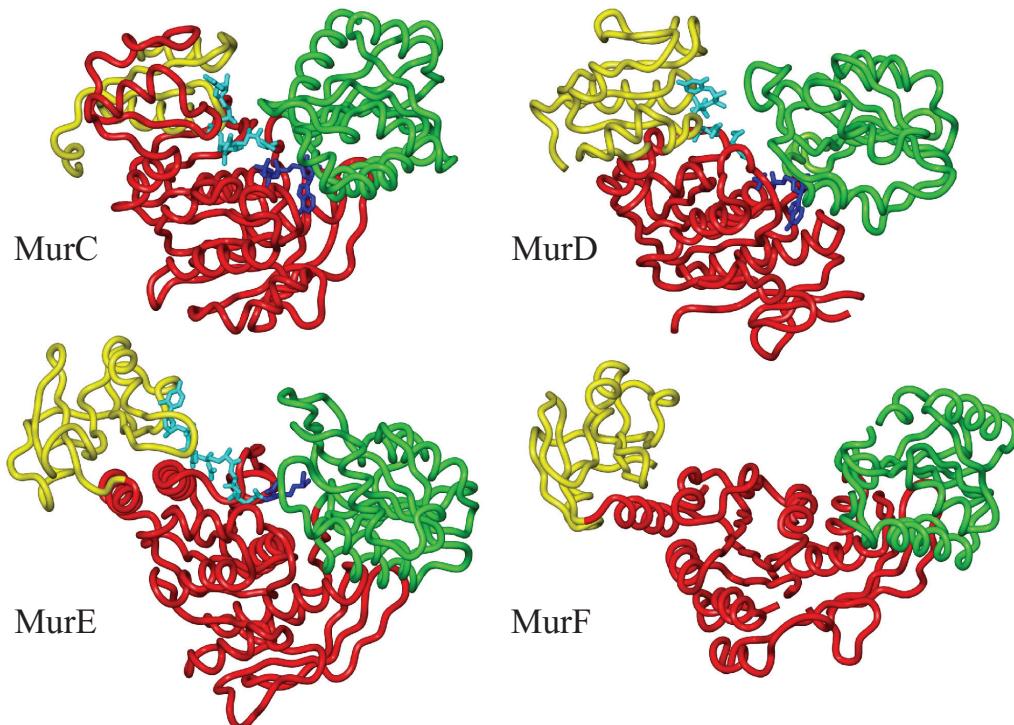
from UDP-MurNAc. They proceed via an ordered kinetic mechanism with a sequential substrate binding order beginning with ATP, followed by the nucleotide substrate and ending with the amino acid or dipeptide (Anderson *et al.*, 1996; Emanuele *et al.*, 1997). The first step of the reaction is the activation of the nucleotide substrate by ATP. Two Mg<sup>2+</sup> ions (one located between ADP and the nucleotide substrate and the other between the β- and γ-phosphate groups of ATP) bridge negatively charged groups of the ATP and nucleotide substrates, thereby facilitating substrate binding and phosphorylation of the C-terminal carboxylate group of the nucleotide substrate. An acyl-phosphate intermediate is formed and stabilized with water molecules (Bertrand *et al.*, 1999; Perdih *et al.*, 2007). The amino group of the condensing amino acid substrate then displaces the phosphate by a S<sub>n</sub>2 nucleophilic attack with the concomitant formation of a peptide bond and a tetrahedral intermediate, which breaks down into the lengthened peptide and P<sub>i</sub> (Fig. 3) (Anderson *et al.*, 1996; Bertrand *et al.*, 1999; Bouhss *et al.*, 2002; El Zoeiby *et al.*, 2003; Mol *et al.*, 2003). For the peptide bond to be formed, a catalytic base is required to accept the proton from the charged amine group of the condensing amino acid. However, Perdih *et al.* evaluated the probability of proton transfer to either the γ-phosphate of ATP or the Mur ligase to be energetically too demanding to fit in the normal energy scope of the reaction. They thus suggested that the amino acid substrate enters the enzymatic reaction in its deprotonated form to execute the nucleophilic attack (Perdih *et al.*, 2009a).

### Similar tridimensional structures

The Mur ligases share the same three-domain topology and active-site architecture (Mol *et al.*, 2003; Spraggon *et al.*, 2004; Smith, 2006). Each Mur ligase is composed of an N-terminal domain 1, a central domain 2 and a C-terminal domain 3 with an active structure assembling at the common domain interface (Fig. 4) (Mol *et al.*, 2003).

Domain 1 binds the nucleotide substrate. For the *E. coli* enzymes, it consists of a five-stranded parallel β-sheet surrounded by two α-helices in MurE, three helices in MurF, and four helices in MurC and MurD. The N-terminal domain of MurC and MurD is reminiscent of the Rossmann dinucleotide-binding fold (Bertrand *et al.*, 2000; Yan *et al.*, 2000; Gordon *et al.*, 2001; Katz and Caufield, 2003; Deva *et al.*, 2006). MurC and MurD bind the UDP moiety of the nucleotide substrate via a cleft formed by two hydrophobic loops and a diphosphate-binding pocket comprising a glycine-rich dinucleotide loop (Fig. 4). The uracil ring and ribose hydroxyl groups are anchored by hydrogen bonding at domain 1 while the lactyl side-chain of the muramic acid extends towards the catalytic centre and interacts with a Mg<sup>2+</sup> ion (Smith, 2006). To accommodate a longer substrate, MurD binds UDP in an opposite orientation in comparison to MurC (Mol *et al.*, 2003). MurE and MurF recognize a lengthening nucleotide substrate and present a more usual N-terminal α/β fold. They bind UDP via a long loop extending towards domain 3 that runs along the back of the uridine group and make four hydrogen bonds with the diphosphate moiety (Fig. 4) (Yan *et al.*, 2000; Gordon *et al.*, 2001; Smith, 2006). The uracil ring packs against an aromatic ring and is anchored at domain 1 by hydrogen bonds. In contrast with MurC and MurD, the pyrophosphate moiety of UDP extends out towards the N-terminal domain for further interactions in MurE and MurF (Fig. 4) (Yan *et al.*, 2000; Smith, 2006). As MurE utilizes the γ- rather than the α-carboxyl group of UDP-MurNAc-peptide to form the peptide bond, it has specific N-terminal binding pockets for both the γ- and α-carboxyl groups facing the ATP binding site on domain 2 (Bertrand *et al.*, 1999; Green, 2002).

The central domain consists of a six-stranded parallel β-sheet for MurD, MurE and MurF, and a seven-stranded parallel β-sheet for MurC (Fig. 4). The β-sheet is surrounded by seven α-helices in MurD and MurE, four helices in MurC and eight helices in MurF. This domain is also flanked by a smaller antiparallel three-stranded β-sheet. Domain 2 includes the mononucleotide-binding fold and is responsible for the binding of ATP (Fig. 4) (Bertrand *et al.*, 1997; 1999; Yan *et al.*, 2000; Gordon *et al.*, 2001; Deva *et al.*, 2006). It also contains the Glu and His residues important for the co-ordination of the Mg<sup>2+</sup> ions and a conserved carbamoylated Lys residue in MurD,



**Fig. 4.** Representation of the tridimensional structures of MurC, MurD, MurE and MurF. Domain 1 of the Mur ligases is represented in yellow, domain 2 in red and domain 3 in green. MurC: structure resolved to 1.7 Å (Mol *et al.*, 2003) along with its UDP-MurNAc-L-Ala product (light blue) and the non-hydrolysable ATP analogue AMPPNP (dark blue). MurD: structure resolved to 1.7 Å (Bertrand *et al.*, 1999) with its UDP-MurNAc-L-Ala-d-Glu product; the UDP-MurNAc-L-Ala moiety is depicted in light blue and the d-Glu moiety in dark blue. MurE: structure resolved to 2 Å (Gordon *et al.*, 2001) with its UDP-MurNAc-L-Ala-d-Glu-mA2pm product; the UDP-MurNAc-L-Ala-d-Glu moiety is depicted in light blue and the mA2pm moiety in dark blue. MurF: structure resolved to 2.3 Å (Yan *et al.*, 2000) in its 'open' substrate-free conformation. The image was created using INSIGHTII version 2000.1 (Accelrys) on a Silicon Graphics Fuel workstation. Crystal structure co-ordinates were retrieved from the Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>): MurC, 1P3D; MurD, 2UAG; MurE, 1E8C; MurF, 1GG4.

MurE and MurF or Glu residue in MurC for the stabilization of the second  $Mg^{2+}$  binding site (Smith, 2006).

The third domain consists of a six-stranded  $\beta$ -sheet with one antiparallel and five parallel  $\beta$ -strands, surrounded by five  $\alpha$ -helices. This domain contains the Rossmann dinucleotide-binding fold and binds the amino acid substrates (Fig. 4) (Bertrand *et al.*, 1997; Yan *et al.*, 2000; Gordon *et al.*, 2001; Katz and Caufield, 2003; Mol *et al.*, 2003; Deva *et al.*, 2006; Kurokawa *et al.*, 2008). In MurC, a His residue in domain 3 forms a shallow hydrophobic pocket that allows proper binding of the short side-chain of L-Ala (Kurokawa *et al.*, 2008). The C-terminal domain of the Mur ligases also plays a critical role in capping the ATP binding site and inserting a loop into the active site to orient the amino acid (Mol *et al.*, 2003). A well-conserved Arg residue interacts with the amino acid and the  $\alpha$ -phosphate of ATP (Bouhss *et al.*, 1997; Bertrand *et al.*, 1999; Mol *et al.*, 2003; Deva *et al.*, 2006). A considerable shift in the position of the Arg residue has been observed upon binding of ADP, presumably allowing interaction with the amino acid or assisting the nucleophilic attack (Bertrand *et al.*, 1999; Kurokawa *et al.*, 2008).

#### Conformation changes and formation of the active site

To form a potent active site, the 'open' substrate-free Mur ligase structure must undergo important rearrangements upon substrate binding to adopt a 'closed' conformation where the C-terminal domain is brought towards the N-terminal and central domains. ATP binding at domain 3 induces the domain closure and allows proper binding of the second and third substrates (Fig. 4). In *E. coli* MurD, the interaction of ATP with the side-chain of Arg302 triggers a conformational change of the C-terminal domain, allowing the Lys198 and His183 residues to interact with the nucleotide substrate and direct it into its binding pocket. When both the ATP and nucleotide substrates are well positioned into their respective binding sites, a final rotation of the C-terminal domain brings the enzyme into its active 'closed' conformation (Perdih *et al.*, 2007). MurE and MurF undergo a more pronounced domain rotation in comparison to MurC and MurD to widen the interdomain cleft and accommodate the longer nucleotide substrate (Mol *et al.*, 2003; Longenecker *et al.*, 2005). These enzymes position this substrate further from the active site to allow the

peptide tail to fold up against domain 2 (Smith, 2006). At this stage, the ATP and nucleotide substrates are brought together and correctly oriented for acyl-phosphate intermediate formation. The Mur ligases finally bind and orient the amino acid substrate for nucleophilic attack, and stabilize the resulting tetrahedral intermediate to lower the activation barrier and accelerate catalysis (Fig. 3) (Bertrand *et al.*, 1999; 2000; Yan *et al.*, 2000; Gordon *et al.*, 2001; Mol *et al.*, 2003; Perdih *et al.*, 2007).

### Development of multi-target Mur ligase inhibitors

The detailed substrate binding modes, kinetic mechanistic and structural features of the four Mur ligases from many bacterial species have opened the path to the computational design of small inhibitory molecules by homology modelling, virtual screenings, dynamic simulations, molecular docking and structure–activity relationship studies (Katz & Caufield, 2003; Silver, 2003; Smith, 2006; Kotnik *et al.*, 2007a; Anuradha *et al.*, 2010; Hrast *et al.*, 2014). Libraries of chemical or natural compounds have also been used to identify inhibitors of Mur ligase activities (Silver, 2003; 2013; Kotnik *et al.*, 2007a; Hrast *et al.*, 2014). Bioactive Mur ligase proteins can be easily obtained in large quantities at high purity. Their enzymatic activity is coupled with ATP hydrolysis, which can easily be quantified and exploited to screen for inhibitory molecules (Zoeiby *et al.*, 2003; Brown and Wright, 2005; Silver, 2006). Although the ATP and amino acid substrates of the Mur ligases can be easily acquired, the unavailability of nucleotide substrates have hampered the study of the Mur ligases for a long time. Fortunately, they are now available for purchase at the BaCWAN facility of the University of Warwick. Since the Mur ligase enzymes possess several conserved amino acid residues in their active sites for substrate binding and enzymatic activity, proceed with the same catalytic mechanism and share key structural features, comparative molecular studies should allow the rational design and/or structure-based optimization of inhibitors for the development of molecules that efficiently target many Mur ligases. The next sections of this review will address different strategies that could be used to exploit the biology of the amide ligases for the development of multi-target inhibitors. The inhibitory and structural details of the identified Mur ligase inhibitors is beyond the scope of this review and has been recently covered by Hrast *et al.* (2014).

### Blocking the binding of the nucleotide substrates

As there are strong similarities in the UDP-binding mode of MurC and MurD, and of MurE and MurF, it should be possible to design molecules that inhibit at least

two Mur ligase enzymes by preventing the binding of their nucleotide substrates (Smith, 2006; Zidar *et al.*, 2011). Encouragingly, Tomasic *et al.* have reported the 5-benzylidenethiazolidin-4-one compounds as multi-target inhibitors of MurD, MurE and MurF. The most potent compound has been shown to have IC<sub>50</sub> values between 2 and 6 µM and to interact mainly with the residues flanking the UDP- MurNAc-L-Ala binding site in the MurD structure (Tomasic *et al.*, 2010).

### Targeting the ATP binding site

The ATP-binding domain of the Mur ligases has the highest level of sequence and structural similarity (Eveland *et al.*, 1997; Smith, 2006), and is not closely related to any ATP-utilizing human enzyme (Skedelj *et al.*, 2011). In addition to presenting a shortened version of the classical P-loop consensus sequence (Bouhss *et al.*, 1997; Sheng *et al.*, 2000), Mur ligases display a P-loop conformation that differs from the classical ATP-binding loop (Bouhss *et al.*, 1997; Sheng *et al.*, 2000). Compounds with an N-acylhydrazone scaffold have been described as micromolar inhibitors of both MurC and MurD and are predicted to target the enzyme ATP binding sites (Sink *et al.*, 2008). Furthermore, a virtual screening of the zinc drug-like database for potential ATP-competitive inhibitors has identified compounds with a weak dual inhibitory activity against MurC and MurD (Tomasic *et al.*, 2012).

### Inhibiting the catalytic mechanism

The catalytic mechanism of the Mur ligases can be strongly inhibited by molecular adducts that mimic the structure of the amino acid substrate in its tetrahedral transition state (Fig. 3). The first transition-state analogue inhibitors of the Mur ligases were substituted derivatives of phosphinate. This moiety is composed of a dipeptide analogue linked to uridine diphosphate by a hydrophobic spacer and displays a tetrahedral geometry (Tanner *et al.*, 1996; Strancar *et al.*, 2006; Hrast *et al.*, 2014). Promisingly, Strancar *et al.* reported that some phosphinate inhibitors of MurD also inhibit MurE with IC<sub>50</sub> values in the micromolar range (Strancar *et al.*, 2007). Sulphonamide derivatives based on naphthalene-N-sulphonyl-D-glutamic have then been designed as transition-state analogue inhibitors of MurD (Kotnik *et al.*, 2007b; Humljan *et al.*, 2008; Susic *et al.*, 2011; Simcic *et al.*, 2012). Based on the structural information of MurD enzyme in complex with N-sulphonyl-D-glutamic inhibitors, Perdih *et al.* performed a virtual screening and identified benzene 1,3-dicarboxylic acid derivatives that inhibit both MurD and MurE with IC<sub>50</sub> values in the micromolar range (Perdih *et al.*, 2009b). Quite excitingly, this team recently reported benzene-1,3-

dicarboxylic acid 2,5-dimethylpyrrole derivatives as micro-molar inhibitors of the four amide ligase enzymes (Perdih *et al.*, 2014).

#### Exploiting the conformational changes

As the Mur ligases undergo important conformational changes upon substrate binding to form a potent active site, it might be feasible to develop compounds that trap the enzymes in an inactive 'open' state or capture them in a topologically compact state where the substrates can no longer access their binding sites. Indeed, Hrast *et al.* have reported improved cyanothiophene inhibitors of MurF with IC<sub>50</sub> values in the nanomolar and micromolar range that bind at the interface between the three structural domains of the protein and induce interdomain closure reminiscent of the domain arrangement yielding the 'closed' conformation state (Hrast *et al.*, 2013). Longenecker *et al.* have selected a novel class of MurF inhibitors from a virtual screening of the Abbott small molecule library that share the same mode of action and are predicted to have low micromolar IC<sub>50</sub> values according to their binding constants (Longenecker *et al.*, 2005). As the key amino acids involved in domain closure of Mur ligases are being identified (Perdih *et al.*, 2007), the design of multi-target inhibitors constraining or inducing conformational changes is a promising path.

#### Concluding remarks and future prospects

The Mur ligases are a group of closely related proteins essential for the biosynthesis of the bacterial PG. Their characteristics make them highly suitable targets for the development of new classes of antibacterial agents. Each Mur ligase possesses specific advantages as an individual antibacterial target, and the four enzymes share conserved features that can be exploited for the design of inhibitors that simultaneously target them all. To reach a strong effect on bacterial growth or survival, Mur ligases would have to be strongly inhibited in the bacterial cell when targeted individually. However, inhibitors targeting multiple steps in the Mur ligase pathway would presumably require partial inhibition at each step to provide a bacteriostatic or bacteriolytic effect (Silver, 2006). Furthermore, antibacterial agents based on multi-target inhibitors would have a reduced likelihood of target-mediated resistance development since mutations conferring resistance would have to occur in many target genes in a single bacterial generation. Multi-target Mur ligase inhibitors could either target the UDP or ATP binding site, mimic the tetrahedral adduct involved in the catalytic mechanism, or interfere with the conformational changes by trapping the Mur ligases in an inactive 'open' state or constraining them in a 'closed' conformation. This review described many dual and multi-

target Mur inhibitors as promising starting point for the development of antibacterial compounds targeting multiple Mur ligases.

Even though none of the Mur ligase inhibitors identified so far has yet been optimized for the production of therapeutic antibacterial agents (Silver, 2006; 2011; 2013; Kotnik *et al.*, 2007a; Hrast *et al.*, 2014), several reports have described promising Mur ligase inhibitors with improved potency and antibacterial activity. The team of Baum *et al.* has identified three inhibitors with antibacterial activity: diaryquinolines 1 and 2 (Baum *et al.*, 2007), and phenylpiperidine (Baum *et al.*, 2009). These compounds have been shown to inhibit *E. coli* MurF and to consequently decrease the amount of the MurF product *in vivo*, thus inhibiting PG synthesis *in vivo* and causing bacterial cell lysis (Baum *et al.*, 2007; 2009). Recently, a new class of pyrazolopyrimidine inhibitors with sub-nanomolar potency against *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa* MurC enzymes have been reported. These compounds have been shown to inhibit PG biosynthesis *in vivo* due to the targeting of MurC (Hameed *et al.*, 2014). These studies suggest that the Mur ligases perform rate-limiting steps and confirm their validity as antibacterial targets. However, the antibacterial activities of these Mur inhibitors were observed only when the bacterial cells were permeabilized (Baum *et al.*, 2007; 2009; Hameed *et al.*, 2014).

One of the most difficult aspects of computer assisted modelling, biochemical screening and subsequent synthetic chemical optimization is that compounds identified as enzyme inhibitors frequently lack biological activity. This is thought to be due in part to the permeability barriers and efflux capabilities of bacteria (Payne *et al.*, 2007). The rules of synthetic compounds penetration in bacterial cells remain elusive (Lewis, 2013), and one of the biggest challenge in the development of an antibiotic therapy based on Mur ligase inhibitors will thus be the chemical optimization of the compounds to allow passage through the bacterial cell envelope and stability in the cytoplasm. Inhibitors may alternatively be conjugated to a stable moiety that promotes uptake via active bacterial transport mechanisms (Silver, 2003; 2006). Mur inhibitors may also be used in synergy with permeabilizers of bacterial envelopes such as polymyxin B and cationic peptides (Nikaido, 2003; Silver, 2003; 2006; Baum *et al.*, 2007; 2009; Hameed *et al.*, 2014). The investigation of untapped natural product sources such as uncultured bacteria could also yield to Mur ligase inhibitors of therapeutic value (Lewis, 2013).

One speculative possibility to explain the lack of activity of most Mur inhibitors *in vivo* is that the action of the Mur pathway is concerted, perhaps performing as a multi-enzyme complex with channelling of intermediates, the active sites being inaccessible to inhibitors (Silver, 2011). Interaction of Mur ligases with other PG synthesizing

enzymes, cytoskeleton elements and cell division proteins have been reported but no direct protein–protein interactions have been detected between the Mur ligases so far. Bacterial two-hybrid experiments have indicated that MurF interacts with MraY in *Caulobacter crescentus* (White *et al.*, 2010). Purified MurF from *Chlamydia pneumoniae* have been shown to interact with the cytoskeleton element MreB and improve its polymerization (Gaballah *et al.*, 2011). Purified MurD, MurE and MurF enzymes from *Thermotoga maritima* have been reported to interact individually with MurG and MreB, but do not interact with each other (Favini-Stabile *et al.*, 2013). Purified Mur ligases from *M. tuberculosis* have also been showed not to interact with each other, but to interact with the cell division proteins FtsZ, FtsW, FtsQ and Wag31, and with the regulatory proteins PknA and PknB (Munshi *et al.*, 2013). A better understanding of the mode of action of the Mur ligases *in vivo* and of their protein–protein interactions in the wider context of bacterial cell wall synthesis, morphogenesis and cell division will be critical for the design of clinically useful inhibitors.

## References

- Anderson, M.S., Eveland, S.S., Onishi, H.R., and Pompliano, D.L. (1996) Kinetic mechanism of the *Escherichia coli* UDPMurNAc-tripeptide D-alanyl-D-alanine-adding enzyme: use of a glutathione S-transferase fusion. *Biochemistry* **35**: 16264–16269.
- Anishetty, S., Pulimi, M., and Pennathur, G. (2005) Potential drug targets in *Mycobacterium tuberculosis* through metabolic pathway analysis. *Comput Biol Chem* **29**: 368–378.
- Anuradha, C.M., Mulakayala, C., Babajan, B., Naveen, M., Rajasekhar, C., and Kumar, C.S. (2010) Probing ligand binding modes of *Mycobacterium tuberculosis* MurC ligase by molecular modeling, dynamics simulation and docking. *J Mol Model* **16**: 77–85.
- Baum, E.Z., Crespo-Carbone, S.M., Klinger, A., Foleno, B.D., Turchi, I., Macielag, M., and Bush, K. (2007) A MurF inhibitor that disrupts cell wall biosynthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **51**: 4420–4426.
- Baum, E.Z., Crespo-Carbone, S.M., Foleno, B.D., Simon, L.D., Guillemont, J., Macielag, M., and Bush, K. (2009) MurF inhibitors with antibacterial activity: effect on muropeptide levels. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 3240–3247.
- Bertrand, J.A., Auger, G., Fanchon, E., Martin, L., Blanot, D., van Heijenoort, J., and Dideberg, O. (1997) Crystal structure of UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanine:D-glutamate ligase from *Escherichia coli*. *EMBO J* **16**: 3416–3425.
- Bertrand, J.A., Auger, G., Martin, L., Fanchon, E., Blanot, D., Le Beller, D., *et al.* (1999) Determination of the MurD mechanism through crystallographic analysis of enzyme complexes. *J Mol Biol* **289**: 579–590.
- Bertrand, J.A., Fanchon, E., Martin, L., Chantalat, L., Auger, G., Blanot, D., *et al.* (2000) ‘Open’ structures of MurD: domain movements and structural similarities with folylyglutamate synthetase. *J Mol Biol* **301**: 1257–1266.
- Boniface, A., Bouhss, A., Mengin-Lecreux, D., and Blanot, D. (2006) The MurE synthetase from *Thermotoga maritima* is endowed with an unusual D-lysine-adding activity. *J Biol Chem* **281**: 15680–15686.
- Bouhss, A., Mengin-Lecreux, D., Blanot, D., van Heijenoort, J., and Parquet, C. (1997) Invariant amino acids in the Mur peptide synthetases of bacterial peptidoglycan synthesis and their modification by site-directed mutagenesis in the UDP-MurNAc:L-alanine ligase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **36**: 11556–11563.
- Bouhss, A., Dementin, S., van Heijenoort, J., Parquet, C., and Blanot, D. (2002) MurC and MurD synthetases of peptidoglycan biosynthesis: borohydride trapping of acyl-phosphate intermediates. *Methods Enzymol* **354**: 189–196.
- Brown, E.D., and Wright, G.D. (2005) New targets and screening approaches in antimicrobial drug discovery. *Chem Rev* **105**: 759–774.
- Bugg, T.D., and Walsh, C.T. (1992) Intracellular steps of bacterial cell wall peptidoglycan biosynthesis: enzymology, antibiotics, and antibiotic resistance. *Nat Prod Rep* **9**: 199–215.
- Burghout, P., Quintero, B., Bos, L., Beilharz, K., Veening, J.W., de Jonge, M.I., *et al.* (2013) A single amino acid substitution in the MurF UDP-MurNAc-pentapeptide synthetase renders *Streptococcus pneumoniae* dependent on CO<sub>2</sub> and temperature. *Mol Microbiol* **89**: 494–506.
- Cava, F., de Pedro, M.A., Lam, H., Davis, B.M., and Waldor, M.K. (2011) Distinct pathways for modification of the bacterial cell wall by non-canonical D-amino acids. *EMBO J* **30**: 3442–3453.
- Consaul, S.A., Wright, L.F., Mahapatra, S., Crick, D.C., and Pavelka, M.S., Jr (2005) An unusual mutation results in the replacement of diaminopimelate with lanthionine in the peptidoglycan of a mutant strain of *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* **187**: 1612–1620.
- Daniel, R.A., and Errington, J. (2003) Control of cell morphogenesis in bacteria. *Cell* **113**: 767–776.
- Davies, J., and Davies, D. (2010) Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* **74**: 417–433.
- Deva, T., Baker, E.N., Squire, C.J., and Smith, C.A. (2006) Structure of *Escherichia coli* UDP-N-acetylmuramoyl:L-alanine ligase (MurC). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **62**: 1466–1474.
- East, S.P., and Silver, L.L. (2013) Multitarget ligands in antibacterial research: progress and opportunities. *Expert Opin Drug Discov* **8**: 143–156.
- El Zeeby, A., Sanschagrin, F., and Levesque, R.C. (2003) Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors. *Mol Microbiol* **47**: 1–12.
- Emanuele, J.J., Jr, Jin, H., Yanchunas, J., Jr, and Villafranca, J.J. (1997) Evaluation of the kinetic mechanism of *Escherichia coli* uridine diphosphate-N-acetylmuramate:L-alanine ligase. *Biochemistry* **36**: 7264–7271.
- Eveland, S.S., Pompliano, D.L., and Anderson, M.S. (1997) Conditionally lethal *Escherichia coli* murein mutants contain point defects that map to regions conserved among murein and foyl poly-gamma-glutamate ligases: identification of a ligase superfamily. *Biochemistry* **36**: 6223–6229.
- Falk, S.P., and Weisblum, B. (2013) Phosphorylation of the *Streptococcus pneumoniae* cell wall biosynthesis enzyme

- MurC by a eukaryotic-like Ser/Thr kinase. *FEMS Microbiol Lett* **340**: 19–23.
- Fauci, A.S., and Morens, D.M. (2012) The perpetual challenge of infectious diseases. *N Engl J Med* **366**: 454–461.
- Favini-Stabile, S., Contreras-Martel, C., Thielens, N., and Dessen, A. (2013) MreB and MurG as scaffolds for the cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *Environ Microbiol* **15**: 3218–3228.
- Fluza, M., Canova, M.J., Patin, D., Letek, M., Zanella-Cleon, I., Becchi, M., et al. (2008) The MurC ligase essential for peptidoglycan biosynthesis is regulated by the serine/threonine protein kinase PknA in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Chem* **283**: 36553–36563.
- Gaballah, A., Kloeckner, A., Otten, C., Sahl, H.G., and Henrichfreise, B. (2011) Functional analysis of the cytoskeleton protein MreB from *Chlamydophila pneumoniae*. *PLoS ONE* **6**: e25129.
- Gordon, E., Flouret, B., Chantalat, L., van Heijenoort, J., Mengin-Lecreux, D., and Dideberg, O. (2001) Crystal structure of UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate:meso-diaminopimelate ligase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **276**: 10999–11006.
- Green, D.W. (2002) The bacterial cell wall as a source of antibacterial targets. *Expert Opin Ther Targets* **6**: 1–19.
- Hameed, P.S., Manjrekar, P., Chinnappattu, M., Humnabadkar, V., Shanbhag, G., Kedari, C., et al. (2014) Pyrazolopyrimidines establish MurC as a vulnerable target in *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *ACS Chem Biol* [Epub ahead of print].
- van Heijenoort, J. (2001) Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan monomer unit. *Nat Prod Rep* **18**: 503–519.
- Hesse, L., Bostock, J., Dementin, S., Blanot, D., Mengin-Lecreux, D., and Chopra, I. (2003) Functional and biochemical analysis of *Chlamydia trachomatis* MurC, an enzyme displaying UDP-N-acetylmuramate:amino acid ligase activity. *J Bacteriol* **185**: 6507–6512.
- Holtje, J.V. (1998) Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 181–203.
- Horcayo, P., de Pedro, M.A., and Cava, F. (2012) Peptidoglycan plasticity in bacteria: stress-induced peptidoglycan editing by noncanonical D-amino acids. *Microb Drug Resist* **18**: 306–313.
- Hrast, M., Turk, S., Sosic, I., Knez, D., Randall, C.P., Barreteau, H., et al. (2013) Structure-activity relationships of new cyanothiophene inhibitors of the essential peptidoglycan biosynthesis enzyme MurF. *Eur J Med Chem* **66**: 32–45.
- Hrast, M., Sosic, I., Sink, R., and Gobec, S. (2014) Inhibitors of the peptidoglycan biosynthesis enzymes MurA–F. *Bioorg Chem* **55**: 2–15.
- Humljan, J., Kotnik, M., Contreras-Martel, C., Blanot, D., Urleb, U., Dessen, A., et al. (2008) Novel naphthalene-N-sulfonyl-D-glutamic acid derivatives as inhibitors of MurD, a key peptidoglycan biosynthesis enzyme. *J Med Chem* **51**: 7486–7494.
- Jin, H., Emanuele, J.J., Jr, Fairman, R., Robertson, J.G., Hail, M.E., Ho, H.T., et al. (1996) Structural studies of *Escherichia coli* UDP-N-acetylmuramate:L-alanine ligase. *Biochemistry* **35**: 1423–1431.
- Katz, A.H., and Caufield, C.E. (2003) Structure-based design approaches to cell wall biosynthesis inhibitors. *Curr Pharm Des* **9**: 857–866.
- Kotnik, M., Anderluh, P.S., and Prezelj, A. (2007a) Development of novel inhibitors targeting intracellular steps of peptidoglycan biosynthesis. *Curr Pharm Des* **13**: 2283–2309.
- Kotnik, M., Humljan, J., Contreras-Martel, C., Oblak, M., Kristan, K., Herve, M., et al. (2007b) Structural and functional characterization of enantiomeric glutamic acid derivatives as potential transition state analogue inhibitors of MurD ligase. *J Mol Biol* **370**: 107–115.
- Kurokawa, K., Nishida, S., Ishibashi, M., Mizumura, H., Ueno, K., Yutsudo, T., et al. (2008) *Staphylococcus aureus* MurC participates in L-alanine recognition via histidine 343, a conserved motif in the shallow hydrophobic pocket. *J Biochem (Tokyo)* **143**: 417–424.
- Lam, H., Oh, D.C., Cava, F., Takacs, C.N., Clardy, J., de Pedro, M.A., and Waldor, M.K. (2009) D-amino acids govern stationary phase cell wall remodeling in bacteria. *Science* **325**: 1552–1555.
- Lewis, K. (2013) Platforms for antibiotic discovery. *Nat Rev Drug Discov* **12**: 371–387.
- Liechti, G.W., Kuru, E., Hall, E., Kalinda, A., Brun, Y.V., VanNieuwenhze, M., and Maurelli, A.T. (2014) A new metabolic cell-wall labelling method reveals peptidoglycan in *Chlamydia trachomatis*. *Nature* **506**: 507–510.
- Livermore, D.M. (2009) Has the era of untreatable infections arrived? *J Antimicrob Chemother* **64** (Suppl. 1): i29–i36.
- Longenecker, K.L., Stamper, G.F., Hajduk, P.J., Fry, E.H., Jakob, C.G., Harlan, J.E., et al. (2005) Structure of MurF from *Streptococcus pneumoniae* co-crystallized with a small molecule inhibitor exhibits interdomain closure. *Protein Sci* **14**: 3039–3047.
- Lugtenberg, E.J., and v Schijndel-van Dam, A. (1972a) Temperature-sensitive mutants of *Escherichia coli* K-12 with low activities of the L-alanine adding enzyme and the D-alanyl-D-alanine adding enzyme. *J Bacteriol* **110**: 35–40.
- Lugtenberg, E.J., and v Schijndel-van Dam, A. (1972b) Temperature-sensitive mutants of *Escherichia coli* K-12 with low activity of the diaminopimelic acid adding enzyme. *J Bacteriol* **110**: 41–46.
- Lugtenberg, E.J., and v Schijndel-van Dam, A. (1973) Temperature-sensitive mutant of *Escherichia coli* K-12 with an impaired D-alanine:D-alanine ligase. *J Bacteriol* **113**: 96–104.
- Lugtenberg, E.J., De Haas-Menger, L., and Ruyters, W.H. (1972) Murein synthesis and identification of cell wall precursors of temperature-sensitive lysis mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **109**: 326–335.
- McCoy, A.J., and Maurelli, A.T. (2005) Characterization of *Chlamydia MurC-Ddl*, a fusion protein exhibiting D-alanyl-D-alanine ligase activity involved in peptidoglycan synthesis and D-cycloserine sensitivity. *Mol Microbiol* **57**: 41–52.
- Mengin-Lecreux, D., Falla, T., Blanot, D., van Heijenoort, J., Adams, D.J., and Chopra, I. (1999) Expression of the *Staphylococcus aureus* UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate:L-lysine ligase in *Escherichia coli* and effects on peptidoglycan biosynthesis and cell growth. *J Bacteriol* **181**: 5909–5914.
- Mol, C.D., Brooun, A., Dougan, D.R., Hilgers, M.T., Tari, L.W., Wijnands, R.A., et al. (2003) Crystal structures of active

- fully assembled substrate- and product-bound complexes of UDP-N-acetylmuramic acid:L-alanine ligase (MurC) from *Haemophilus influenzae*. *J Bacteriol* **185**: 4152–4162.
- Munshi, T., Gupta, A., Evangelopoulos, D., Guzman, J.D., Gibbons, S., Keep, N.H., and Bhakta, S. (2013) Characterisation of ATP-dependent Mur ligases involved in the biogenesis of cell wall peptidoglycan in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE* **8**: e60143.
- Nikaido, H. (2003) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 593–656.
- Nosal, F., Masson, A., Legrand, R., Blanot, D., Schoot, B., van Heijenoort, J., and Parquet, C. (1998) Site-directed mutagenesis and chemical modification of the two cysteine residues of the UDP-N-acetylmuramoyl:L-alanine ligase of *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **426**: 309–313.
- Payne, D.J., Gwynn, M.N., Holmes, D.J., and Pommiano, D.L. (2007) Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nat Rev Drug Discov* **6**: 29–40.
- Perdih, A., Kotnik, M., Hodoscek, M., and Solmajer, T. (2007) Targeted molecular dynamics simulation studies of binding and conformational changes in *E. coli* MurD. *Proteins* **68**: 243–254.
- Perdih, A., Hodoscek, M., and Solmajer, T. (2009a) MurD ligase from *E. coli*: tetrahedral intermediate formation study by hybrid quantum mechanical/molecular mechanical replica path method. *Proteins* **74**: 744–759.
- Perdih, A., Kovac, A., Wolber, G., Blanot, D., Gobec, S., and Solmajer, T. (2009b) Discovery of novel benzene 1,3-dicarboxylic acid inhibitors of bacterial MurD and MurE ligases by structure-based virtual screening approach. *Bioorg Med Chem Lett* **19**: 2668–2673.
- Perdih, A., Hrast, M., Barreteau, H., Gobec, S., Wolber, G., and Solmajer, T. (2014) Benzene-1,3-dicarboxylic acid 2,5-dimethylpyrrole derivatives as multiple inhibitors of bacterial Mur ligases (MurC–MurF). *Bioorg Med Chem* **22**: 4124–4134.
- Ruane, K.M., Lloyd, A.J., Fulop, V., Dowson, C.G., Barreteau, H., Boniface, A., et al. (2013) Specificity determinants for lysine incorporation in *Staphylococcus aureus* peptidoglycan as revealed by the structure of a MurE enzyme ternary complex. *J Biol Chem* **288**: 33439–33448.
- Sheng, Y., Sun, X., Shen, Y., Bognar, A.L., Baker, E.N., and Smith, C.A. (2000) Structural and functional similarities in the ADP-forming amide bond ligase superfamily: implications for a substrate-induced conformational change in folylpolyglutamate synthetase. *J Mol Biol* **302**: 427–440.
- Silhavy, T.J., Kahne, D., and Walker, S. (2010) The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**: a000414.
- Silver, L.L. (2003) Novel inhibitors of bacterial cell wall synthesis. *Curr Opin Microbiol* **6**: 431–438.
- Silver, L.L. (2006) Does the cell wall of bacteria remain a viable source of targets for novel antibiotics? *Biochem Pharmacol* **71**: 996–1005.
- Silver, L.L. (2011) Challenges of antibacterial discovery. *Clin Microbiol Rev* **24**: 71–109.
- Silver, L.L. (2013) Viable screening targets related to the bacterial cell wall. *Ann N Y Acad Sci* **1277**: 29–53.
- Simcic, M., Sosic, I., Hodoscek, M., Barreteau, H., Blanot, D., Gobec, S., and Grdadolnik, S.G. (2012) The binding mode of second-generation sulfonamide inhibitors of MurD: clues for rational design of potent MurD inhibitors. *PLoS ONE* **7**: e52817.
- Sink, R., Kovac, A., Tomasic, T., Rupnik, V., Boniface, A., Bostock, J., et al. (2008) Synthesis and biological evaluation of N-acylhydrazone inhibitors of MurC and MurD ligases. *ChemMedChem* **3**: 1362–1370.
- Skedelj, V., Tomasic, T., Masic, L.P., and Zega, A. (2011) ATP-binding site of bacterial enzymes as a target for antibacterial drug design. *J Med Chem* **54**: 915–929.
- Smith, C.A. (2006) Structure, function and dynamics in the mur family of bacterial cell wall ligases. *J Mol Biol* **362**: 640–655.
- Sosic, I., Barreteau, H., Simcic, M., Sink, R., Cesar, J., Zega, A., et al. (2011) Second-generation sulfonamide inhibitors of D-glutamic acid-adding enzyme: activity optimisation with conformationally rigid analogues of D-glutamic acid. *Eur J Med Chem* **46**: 2880–2894.
- Spraggon, G., Schwarzenbacher, R., Kreusch, A., Lee, C.C., Abdubek, P., Ambing, E., et al. (2004) Crystal structure of an Udp-N-acetylmuramate-alanine ligase MurC (TM0231) from *Thermotoga maritima* at 2.3 Å resolution. *Proteins* **55**: 1078–1081.
- Strancar, K., Blanot, D., and Gobec, S. (2006) Design, synthesis and structure-activity relationships of new phosphinate inhibitors of MurD. *Bioorg Med Chem Lett* **16**: 343–348.
- Strancar, K., Boniface, A., Blanot, D., and Gobec, S. (2007) Phosphinate inhibitors of UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate:L-lysine ligase (MurE). *Arch Pharm (Weinheim)* **340**: 127–134.
- Tanner, M.E., Vaganay, S., van Heijenoort, J., and Blanot, D. (1996) Phosphinate inhibitors of the D-glutamic acid-adding enzyme of peptidoglycan biosynthesis. *J Org Chem* **61**: 1756–1760.
- Thakur, M., and Chakraborti, P.K. (2008) Ability of PknA, a mycobacterial eukaryotic-type serine/threonine kinase, to transphosphorylate MurD, a ligase involved in the process of peptidoglycan biosynthesis. *Biochem J* **415**: 27–33.
- Tomasic, T., Zidar, N., Kovac, A., Turk, S., Simcic, M., Blanot, D., et al. (2010) 5-Benzylidenethiazolidin-4-ones as multi-target inhibitors of bacterial Mur ligases. *ChemMedChem* **5**: 286–295.
- Tomasic, T., Kovac, A., Klebe, G., Blanot, D., Gobec, S., Kikelj, D., and Masic, L.P. (2012) Virtual screening for potential inhibitors of bacterial MurC and MurD ligases. *J Mol Model* **18**: 1063–1072.
- Typas, A., Banzhaf, M., Gross, C.A., and Vollmer, W. (2012) From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat Rev Microbiol* **10**: 123–136.
- Vollmer, W., Blanot, D., and de Pedro, M.A. (2008) Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 149–167.
- Walsh, A.W., Falk, P.J., Thanassi, J., Discotto, L., Pucci, M.J., and Ho, H.T. (1999) Comparison of the D-glutamate-adding enzymes from selected gram-positive and gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **181**: 5395–5401.
- White, C.L., Kitich, A., and Gober, J.W. (2010) Positioning cell wall synthetic complexes by the bacterial morphogenetic proteins MreB and MreD. *Mol Microbiol* **76**: 616–633.
- Yan, Y., Munshi, S., Leiting, B., Anderson, M.S., Chrzas, J.,

- and Chen, Z. (2000) Crystal structure of *Escherichia coli* UDPMurNAc-tripeptide d-alanyl-d-alanine-adding enzyme (MurF) at 2.3 Å resolution. *J Mol Biol* **304**: 435–445.
- Zidar, N., Tomasic, T., Sink, R., Kovac, A., Patin, D., Blanot, D., et al. (2011) New 5-benzylidenethiazolidin-4-one inhibitors of bacterial MurD ligase: design, synthesis, crystal structures, and biological evaluation. *Eur J Med Chem* **46**: 5512–5523.
- Zoeiby, A.E., Beaumont, M., Dubuc, E., Sanschagrin, F., Voyer, N., and Levesque, R.C. (2003) Combinatorial enzymatic assay for the screening of a new class of bacterial cell wall inhibitors. *Bioorg Med Chem* **11**: 1583–1592.