



HAL
open science

La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, une protéine de la glycolyse présente à la surface cellulaire, est impliquée dans la reconnaissance par le système du complément chez *Streptococcus pneumoniae*

Rémi Terrasse

► To cite this version:

Rémi Terrasse. La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, une protéine de la glycolyse présente à la surface cellulaire, est impliquée dans la reconnaissance par le système du complément chez *Streptococcus pneumoniae*. Bactériologie. Université de Grenoble, 2013. Français. NNT : . tel-01118661v1

HAL Id: tel-01118661

<https://theses.hal.science/tel-01118661v1>

Submitted on 19 Feb 2015 (v1), last revised 3 Jul 2017 (v2)

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Virologie - Microbiologie - Immunologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Rémi TERRASSE

Thèse dirigée par **Anne-Marie DI GUILMI**

Co-encadrée par **Philippe FRACHET**

préparée au sein du **Groupe pneumocoque – Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre EBEL – UMR 5075**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, une protéine de la glycolyse présente à la surface cellulaire, est impliquée dans la reconnaissance par le système du complément chez *Streptococcus pneumoniae*

Thèse soutenue publiquement le **7 novembre 2013**,
devant le jury composé de :

Dr Philippe FRACHET

Maître de conférences universitaire à l'UJF, Président

Pr Patrick TRIEU-CUOT

Professeur à l'institut Pasteur, Rapporteur

Pr François VANDENESCH

Professeur des universités à l'UCBL, Rapporteur

Dr Anne VIANNEY

Maître de conférences universitaire à l'UCBL, Examinatrice

Dr Chantal DUMESTRE-PERARD

Maître de conférences universitaire à l'UJF, Examinatrice

Dr Anne Marie DI GUILMI

Directrice de recherche au CEA, Directrice de thèse



Il y a en effet une passion mâle et légitime pour l'égalité qui excite les hommes à vouloir être tous forts et estimés. Cette passion tend à élever les petits au rang des grands ; mais il se rencontre aussi dans le cœur humain un goût dépravé pour l'égalité, qui porte les faibles à vouloir attirer les forts à leur niveau, et qui réduit les hommes à préférer l'égalité dans la servitude à l'inégalité dans la liberté.

Alexis de Tocqueville, De la démocratie en Amérique

The only sovereign you can allow to rule you is reason.

Terry Goodkind, Faith of the fallen

REMERCIEMENTS

Je souhaite avant tout remercier les professeurs Patrick TRIEU-CUOT, directeur de recherche à l'Institut Pasteur de Paris, et François VANDENESCH, professeur à l'Université Claude Bernard de Lyon, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

J'exprime également toute ma reconnaissance aux docteurs Anne VIANNEY, maître de conférences à l'Université Claude Bernard de Lyon, Chantal DUMESTRE-PERARD et Philippe FRACHET, maîtres de conférences à l'Université Joseph Fourier de Grenoble, de bien vouloir juger mon travail.

Les travaux réalisés dans le cadre de ma thèse de doctorat l'ont été au sein du Groupe Pneumocoque dirigé par Thierry VERNET, à l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble. Je voudrais exprimer ici mes remerciements les plus sincères à Thierry pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, où j'ai passé près de quatre formidables années (en comptant les stages antérieurs à ma thèse), pour m'avoir fait confiance en me confiant des responsabilités, et pour ses conseils.

Bien évidemment, je ne saurais trop remercier Anne Marie DI GUILMI, ma directrice de thèse, qui a eu confiance dans mon travail, n'a jamais manqué d'excellents conseils et a toujours su être à l'écoute de mes idées. Anne Marie, tu as su me pousser à toujours faire de mon mieux, me remonter le moral et me remettre sur les rails quand j'en avais besoins, et je t'en remercie infiniment.

Un grand merci à tous les collaborateurs qui m'ont accompagné au cours de ce travail, Philippe FRACHET, Pascale TACNET-DELORME et Nicole THIELENS qui ont toujours été de bon conseil, Christine GABORIAUD et Christophe MOREAU pour avoir résolu la structure de la GAPDH du pneumocoque et qui j'espère continueront à travailler sur ce projet. Je souhaite également remercier Marie Odile FAUVARQUE-MARAS pour sa participation à mon comité de suivi de Thèse.

Je voudrais également remercier tous les membres du laboratoire, de l'institut et de l'université, présents et anciens, pour leur soutien, leurs conseils et pour la bonne ambiance dans laquelle j'ai pu travailler durant ma thèse. Les chercheurs : Claire DUMORT, Marjolaine NOIRCLERC-SAVOYE (dite « Chef » ou Marjorie, mais en faisant attention aux coups de bac à glace), Cécile MORLOT, André ZAPUN (avec une dédicace spéciale pour les discussions toujours intéressantes sur un peu tout et n'importe quoi) ; les techniciens : Laure BELLARD (la meilleur technicienne du monde entier !), Violaine LANTEZ (tu nous manques), Lucie BAYLE (tu nous manques aussi), Guillaume TOURCIER (idem, même si tu es un ours), Justine CARTANNAZ, Benoit GALLET ; les camarades thésards et post-docs : Xavier HENRY (on ne partage pas forcément les mêmes idées mais ça ne m'empêche pas de t'apprécier), Céline LAFAYE (tu peux toujours m'appeler si tu as un soucis avec un AKTA), Nordine HELLISSA (j'espère que tout ce passe bien en Angleterre), Cécile FROLET, Jules PHILIPPE (vive le porc !), Maxime JACQ (je t'ai bien formé, mon apprenti), Lamya ELMORTAJI (ça me manque quelqu'un avec le même humour que moi...), Jaroslav VORAC, Mélanie VERNERET, Mayebine SALL (ma petite Bibine), Vincent GRASSOT, Laurie-Anne PAYET, Manuel BLANC (il faut qu'on mange ensemble un de ces jours hein !), Filip YABUKARSKY, Alexandre MONOD, Els SAESEN, Sihem BOUGUELIA, Florent BERNAUDAT, Émilie BONCOEUR, Émilie STERMANN, Elodie LOISEL ; les stagiaires également : Mathias RECHENMANN (attention au canard WC, c'est agressif cette bête là), Benjamin DUCHENE (bonne chance au Québec), Florence GUERIN (reviens vite la verte), Julie BONNET, Shona ROBINSON, Petya KALCHEVA, Nina MESSORI, Ana-Maria MARTINEZ-ECRIBANO, Lorraine BENIER, les jumeaux Maxine et Nicolas GAUDIN (au moins vous m'aurez bien fait rigoler), Annegret BRANT, Guillaume CERARDI, Amandine MACCAGNI, Tony FOURNY, Maria FEHRINGER, Sandrine MAITRE, Sheng MA, Nuria, Sandrine (oups), José, Amélie, Ophélie, Pauline (qui devrait s'appeler Marion), Mounia, et probablement d'autres que j'ai oublié.

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien de ma famille proche : ma mère, mon beau-père et ma sœur Mathilde, ainsi que de ma famille un peu plus éloignée (ou de ceux que je considère comme tel) « tonton » Bébère, ma tante Claudine, Cécile, Doudou et Doudounette, et un tas d'autres personnes encore. Je vous aime, et merci pour tout.

SOMMAIRE

| | |
|--|----|
| I- Introduction | 19 |
| I-i- Le pneumocoque | 21 |
| I-i-1- Présentation générale | 21 |
| I-i-2- Epidémiologie | 22 |
| I-i-3- Prophylaxie : la vaccination et ses limites | 23 |
| I-i-3-a- Vaccins polysaccharidiques et conjugués | 23 |
| I-i-3-b- Remplacement sérotypique | 25 |
| I-i-4- Traitements antibiotiques et résistances..... | 26 |
| I-i-4-a- antibiothérapie | 26 |
| I-i-4-b- Résistances aux antibiotiques chez le pneumocoque | 27 |
| I-ii- Commensalisme | 30 |
| I-ii-1- Compétition et synergie | 31 |
| I-ii-1-a- Compétition entre espèces bactériennes | 31 |
| I-ii-1-b- Synergies pneumocoque / virus..... | 32 |
| I-ii-2- Compétence | 32 |
| I-ii-2-a- Découverte de la compétence | 32 |
| I-ii-2-b- Mécanisme de la compétence chez le pneumocoque | 33 |
| I-ii-2-c- Intérêt de la compétence pour le pneumocoque | 35 |
| I-ii-3- Métabolisme et synthèse des sucres | 36 |
| I-ii-4- Adhésion à la muqueuse | 37 |
| I-iii- Transition entre colonisation et infection..... | 38 |
| I-iv- Réponse immunitaire au pneumocoque | 40 |
| I-iv-1- Réponse immunitaire innée au pneumocoque | 40 |
| I-iv-1-a- Acteurs cellulaires de la réponse innée au pneumocoque..... | 40 |
| I-iv-1-b- Mécanisme de la phagocytose | 41 |
| I-iv-1-c- Récepteurs cellulaires reconnaissant le pneumocoque | 42 |
| I-iv-1-d- Acteurs humoraux de la réponse innée au pneumocoque | 46 |
| I-iv-1-e- Le système du complément | 47 |
| I-iv-1-f- C1q, un collagène de défense avec de multiples capacités de liaison..... | 50 |
| I-iv-1-g- Importance du complément dans l'immunité au pneumocoque..... | 54 |

| | |
|---|-----|
| I-iv-2- Réponse immunitaire adaptative au pneumocoque..... | 56 |
| I-v- Complément et apoptose | 60 |
| I-v-1- Apoptose : Rôles et mécanismes..... | 60 |
| I-v-1-a- Rôles physiologiques et pathologiques..... | 60 |
| I-v-1-b- Caractéristiques et mécanismes | 61 |
| I-v-2- Implication du complément dans la phagocytose des cellules apoptotiques ... | 62 |
| I-vi- Surface du pneumocoque | 64 |
| I-vi-1- Structure générale de la surface | 64 |
| I-vi-1-a- Capsule | 65 |
| I-vi-1-b- Peptidoglycane | 67 |
| I-vi-1-c- Acides teichoïques et lipoteichoïques..... | 69 |
| I-vi-2- Protéines associées à la surface du pneumocoque | 71 |
| I-vi-2-a- Ancrage au peptidoglycane..... | 72 |
| I-vi-2-b- Liaison aux acides téichoïques et lipotéichoïques..... | 73 |
| I-vi-2-c- Ancrage lipidique..... | 74 |
| I-vii- Facteurs de virulence du pneumocoque | 76 |
| I-vii-1- Capsule polysaccharidique | 76 |
| I-vii-2- Pneumolysine..... | 77 |
| I-vii-3- Protéines de surface impliqués dans la virulence | 78 |
| I-vii-3-a- Adhésion aux tissus hôtes et invasion | 79 |
| I-vii-3-b- Échappement au système immunitaire | 85 |
| I-viii- Protéines « moonlighting » | 89 |
| I-viii-1- Définition des protéines « moonlighting » | 89 |
| I-viii-2- Les protéines « moonlighting » chez les procaryotes..... | 92 |
| I-viii-2-a- Diversité des protéines et fonctions « moonlighting » chez les procaryotes | 92 |
| I-viii-2-b- Sécrétion des protéines « moonlighting » chez les procaryotes..... | 95 |
| I-viii-3- La GAPDH comme modèle de protéine « moonlighting » | 97 |
| I-viii-3-a- Fonctions « moonlighting » des GAPDH bactériennes..... | 97 |
| I-viii-3-b- Export et association à la surface de la GAPDH chez les bactéries..... | 98 |
| I-viii-3-c- La GAPDH du pneumocoque..... | 100 |
| I-ix- Présentation des travaux..... | 103 |
| I-ix-1- Interaction GAPDH-C1q | 103 |
| I-ix-2- Activation du complément via l'interaction GAPDH-C1q..... | 105 |

| | |
|--|-----|
| I-ix-3- Effet conjugué de la liaison de C1q et du plasminogène sur la GAPDH | 106 |
| I-ix-4- Déterminants moléculaires de l'interaction GAPDH-C1q | 106 |
| I-ix-5- Mécanismes d'export de la GAPDH chez le pneumocoque | 107 |
| II- Matériel et méthodes | 109 |
| II-i- Souches, vecteurs et milieux de culture | 111 |
| II-i-1- Souche d'E. coli | 111 |
| II-i-2- Souches de pneumocoque | 111 |
| II-i-3- Vecteurs | 111 |
| II-i-3-a- Le vecteur pLIM01 | 111 |
| II-i-3-b- Le vecteur pETDuet | 111 |
| II-i-4- Constructions | 112 |
| II-i-4-a- Clonage de la GAPDH du pneumocoque | 112 |
| II-i-4-b- Clonage de la GAPDH humaine | 112 |
| II-i-4-c- Construction du produit PCR destiné à introduire la mutation gapA- HBtail chez le pneumocoque | 112 |
| II-i-5- Milieux de culture | 113 |
| II-i-6- Antibiotiques | 114 |
| II-ii- Techniques de biologie moléculaire | 115 |
| II-ii-1- Mutagenèse | 115 |
| II-ii-2- Transformation des cellules compétentes | 115 |
| II-ii-2-a- Transformation dans E. coli | 115 |
| II-ii-2-b- Transformation dans S. pneumoniae R6 | 116 |
| II-ii-3- Mini préparation d'ADN plasmidique et séquençage | 116 |
| II-iii- Techniques biochimiques | 117 |
| II-iii-1- Production des protéines recombinantes | 117 |
| II-iii-2- Purification des protéines recombinantes | 117 |
| II-iii-3- Analyse des protéines par électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS- PAGE) | 117 |
| II-iii-4- Coloration des protéines au bleu de Coomassie | 118 |
| II-iii-5- Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose | 118 |
| II-iii-6- Immunorévélation des protéines sur membrane de nitrocellulose (Western blot) | 118 |
| II-iii-7- Immobilisation de peptides sur membrane de nitrocellulose | 118 |

| | |
|--|-----|
| II-iii-8- Immunorévélation d'interactions protéines-peptides sur membrane de nitrocellulose (Dot blot) | 119 |
| II-iii-9- Déplétion des IgG sériques | 119 |
| II-iii-10- Mesure d'activité plasmine | 119 |
| II-iii-11- Mesure du dépôt du complément et des IgG sur les GAPDH..... | 120 |
| II-iii-12- Mesure du dépôt du complément sur le pneumocoque | 121 |
| II-iii-13- Tests d'interaction et de compétition en phase solide..... | 121 |
| II-iii-14- Test de compétition par SPR..... | 122 |
| III- Étude des interactions GAPDH-C1q : caractérisation et impact sur la réponse immune | 125 |
| III-i- Présentation | 127 |
| III-ii- Article n°1 | 128 |
| III-iii- Résultats supplémentaires | 176 |
| III-iii-1- Activation du complément..... | 176 |
| III-iii-1-a- Dépôt de C1q, C4b et C3b sériques induit par la GAPDH du pneumocoque | 176 |
| III-iii-1-b- Implication de C1q dans l'activation du complément par la GAPDH du pneumocoque | 177 |
| III-iii-1-c- Rôle des IgG dans l'activation du complément | 179 |
| III-iii-2- Effet du recrutement de plasmine par la GAPDH sur le dépôt du complément..... | 181 |
| III-iii-2-a- Sites de fixation indépendants de C1q et du plasminogène..... | 182 |
| III-iii-2-b- Effet de la plasmine sur le dépôt du complément..... | 184 |
| III-iii-3- Déterminants structuraux de l'interaction GAPDH Spn-C1q..... | 188 |
| III-iii-3-a- identification de résidus impliqués dans l'interaction | 188 |
| III-iii-3-b- Structure cristallographique de la GAPDH du pneumocoque..... | 191 |
| III-iii-3-c- Implication des résidus identifiés dans l'interaction GAPDH-C1q.... | 192 |
| III-iii-4- Déterminants structuraux de l'interaction GAPDH Spn-plasminogène | 193 |
| III-iv- Discussion..... | 196 |
| III-iv-1- La GAPDH présente en surface des cellules humaines est un nouveau ligand de C1q | 196 |
| III-iv-2- Etude biochimique des interactions GAPDH Spn et Hsa-C1q | 196 |
| III-iv-3- Implication de la GAPDH de surface dans la reconnaissance du pneumocoque par C1q..... | 198 |

| | |
|---|-----|
| III-iv-4- Activation du complément par la GAPDH du pneumocoque | 199 |
| III-iv-5- Étude structurale des interactions..... | 200 |
| III-iv-6- Reconnaissance par C1q et activation du complément, un sacrifice acceptable pour la GAPDH du pneumocoque ?..... | 202 |
| IV- Mécanisme d'export et d'association en surface de la GAPDH du pneumocoque ... | 205 |
| IV-i- Présentation | 207 |
| IV-ii- Article n°2 | 208 |
| IV-iii- Discussion | 230 |
| IV-iii-1- Export de la GAPDH par lyse | 230 |
| IV-iii-2- Association de la GAPDH en surface du pneumocoque | 232 |
| V- Conclusions et perspectives | 235 |
| VI- Bibliographie | 243 |
| Annexes | 269 |
| Annexe 1 : Liste des oligonucléotides utilisés pour cette étude..... | 271 |
| Annexe 2 : Liste des peptides synthétisés pour cette étude..... | 272 |
| Communications écrites | 273 |

TABLE DES ILLUSTRATIONS

- Figure I-1 : Morphologie du pneumocoque
- Figure I-2 : Arbre phylogénétique des streptocoques
- Figure I-3 : Remplacement sérotypique chez le pneumocoque
- Figure I-4 : Evolution des PSPD en France sur la période 1984-2010
- Figure I-5 : Mécanisme de la compétence chez le pneumocoque
- Figure I-6 : Principales voies d'invasion du pneumocoque
- Figure I-7 : PRR cellulaires impliqués dans la reconnaissance du pneumocoque
- Figure I-8 : PRR solubles impliqués dans la reconnaissance du pneumocoque
- Figure I-9 : Activation de la cascade du complément
- Figure I-10 : Assemblage et structure de C1q
- Figure I-11 : Diversité de reconnaissance par les têtes globulaires de C1q
- Figure I-12 : Modèle d'activation du complexe C1
- Figure I-13 : Immunité acquise au pneumocoque
- Figure I-14 : Représentation schématique de la surface des bactéries Gram-positif, Gram-négatif et des BAAR
- Figure I-15 : Biosynthèse de la capsule du pneumocoque
- Figure I-16 : Représentation schématique de l'unité de base du peptidoglycane
- Figure I-17 : Biosynthèse du peptidoglycane du pneumocoque
- Figure I-18 : Modèles de la structure des TA / LTA du pneumocoque
- Figure I-19 : Protéines associées à la surface du pneumocoque
- Figure I-20 : Schéma du processus d'adhésion et d'invasion du pneumocoque
- Figure I-21 : Mécanismes d'échappement au système immunitaire du pneumocoque
- Figure I-22 : représentation schématique de la glycolyse
- Figure I-23 : Alignement des séquences protéiques des GAPDH Hsa et Spn
- Figure I-24 : Crible d'interactions entre la GAPDH du pneumocoque et diverses protéines humaines
-
- Figure III-1 : Human GAPDH is a ligand of the C1q globular region
- Figure III-2 : GAPDH and C1qGR co-localize on apoptotic plasma membrane blebs

Figure III-3 : Binding of soluble pneumococcal and human GAPDHs to immobilized C1q and plasminogen by solid-phase assay

Figure III-4 : SPR measurements of pneumococcal and human GAPDH proteins interaction with C1q and its GR

Figure III-5 : Cross-linked complexes of pneumococcal and human GAPDH proteins with C1q

Figure III-6 : Inhibition of surface-exposed GAPDH in mutant pneumococcal strains

Figure III-7 : Binding of pneumococcal R6 and D39 strains on C1q and plasminogen

Figure III-8 : Effect of GAPDH on complement activation

Figure III-9 : Effet des GAPDH recombinantes sur l'activation du complément

Figure III-10 : Implication de C1q dans l'activation du complément par le pneumocoque

Figure III-11 : Rôle de C1q dans l'activation du complément par la GAPDH164

Figure III-12 : Détection de C1q dans les séra NHS et NHSΔC1q

Figure III-13 : Implication des IgG sériques dans l'interaction GAPDH par C1q

Figure III-14 : Implication des IgG sériques dans l'activation du complément par le pneumocoque

Figure III-15 : Analyse de l'intégrité de C3 dans les séra NHS et NHSΔIgG

Figure III-16 : liaison de la GAPDH Spn à C1q et au plasminogène immobilisés en présence de plasminogène soluble

Figure III-17 : Le plasminogène n'inhibe pas l'interaction GAPDH-C1q en test d'interaction en phase solide

Figure III-18 : L'interaction GAPDH-C1q n'est pas inhibée par le plasminogène en résonance plasmonique de surface

Figure III-19 : Le plasminogène recruté par la GAPDH est activable en plasmine

Figure III-20 : Effet de la plasmine sur le dépôt de C1q, C4 et C3

Figure III-21 : Dégradation de C3 par la plasmine recrutée en surface

Figure III-22 : Reconnaissance de peptides de la GAPDH Spn par C1q

Figure III-23 : Inhibition de l'interaction GAPDH-C1q par les peptides

Figure III-24 : Alignement des séquences protéiques des GAPDH Hsa et Spn

Figure III-25 : Structures cristallographiques des GAPDH Spn et Hsa

Figure III-26 : Résidus présents en surface de la GAPDH Spn potentiellement impliqués dans l'interaction avec C1q

Figure III-27 : Les mutants de GAPDHSpn ne diffèrent pas dans leur liaison à C1q

Figure III-28 : Reconnaissance de peptides de la GAPDH Spn par le plasminogène

Figure III-29 : Inhibition de l'interaction GAPDH-C1q par les peptides

Figure III-30 : impact des mutations sur la fixation de la GAPDH au plasminogène

Figure III-S1 : Sub-cellular localization of GAPDH in wild-type and HBt mutant R6 and D39 strains.

Figure IV-1 : Removal of Choline-Binding Proteins inhibits pneumococcal autolysis

Figure IV-2 : Pneumococcal lysis induced by LytA promotes GAPDH surface localization

Figure IV-3 : GAPDH binds to the cell wall²¹⁴

Figure IV-4 : GAPDH binds to the peptidoglycan component of the cell wall

Figure V-1 : Les fonctions « moonlighting » de la GAPDH du pneumocoque

Tableau I-1 : Protéines moonlighting chez les eucaryotes

Tableau I-2 : Protéines « moonlighting » chez les procaryotes

Table III-1 : Kinetics and dissociation constants for the interaction between human and pneumococcal GAPDH and C1q or its isolated globular region (GR)

TABLE DES ABREVIATIONS

°C : degree centigrade
6xHis : étiquette 6 Histidines
Å : Angström
ABC : ATP-Binding Casette
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ANSM : Agence Nationale de Sureté du Médicament
CBD : Choline-binding Domain
CBP : Choline-Binding Protein
CD : Cluster de Différentiation
CNRP : Centre National de Référence du Pneumocoque
CPA : Cellules Présentatrices d'Antigènes
CRP : C-Reactive Protein
CSP : Competence-Stimulating Peptide
CWSS : Cell Wall sorting Signal
DMSO : DiMéthylSulfOxyde
dNTP : désoxyriboNucléotides TriPhosphate
EDTA : EthyleneDiamineTetraAcetic acid
E.S. : Erreur-Standard
E.T. : Ecart-Type
Fab : Fragment variable
Fc: Fragment constant
GAPDH: GlycérAldhéhyde 3-Phosphate DésHydrogénase
HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HRP : HorseRadish Peroxidase
Ig : Immunoglobuline
InVS : Institut national de Veille Sanitaire
IPD: Invasive Pneumococcal Diseases
IPTG : Isopropyl- β -D-thio-galactopyranoside
 k_a : Taux d'association
 k_d : Taux de dissociation
 K_D : Constante de dissociation
kDa : kilo Dalton
KO : KnockOut
LB : Lysogeny Broth
LCR : Liquide Céphalo-Rachidien
LTA : LipoTeichoic Acid
MASP : MBL-Associated Serine Protease
MBL : Mannan-Binding Lectin
MCS : Multiple Cloning Site
MyD88 : Myeloid Differentiation primary response gene 88

NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NAG : N-Acetyl Glucosamine
NAM : N-Acetyl Muramic acid
NBD : Nucleotide Binding Domain
NET : Neutrophil Extracellular Trap
NF- κ B : Nuclear Factor-kappa B
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PAMP : Pathogen-Associated Molecular Patterns
PBP : Penicillin Binding Protein
PBS : Phosphate Buffered Saline
PCR : Polymerase Chain Reaction
PM : Poids Moléculaire
PRR : Pattern Recognition Receptors
PS : Phosphatidylsérine
RBS : Ribosome Binding Site
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
SAP : Serum Amyloid P component
SBR : Substrate Binding Receptor
SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SP : Surfactant Protein
TA : Teichoic Acid
TB : Terrific Broth
TEV : Tobacco etch virus
TLR : Toll Like Receptor
TH : Todd-Hewitt Broth
THY : Todd-Hewitt Yeast
TMD : TransMembrane Domain
TNF : Tumor Necrosis Factor

I- Introduction

I-i- Le pneumocoque

I-i-1- Présentation générale

Le pneumocoque est une bactérie Gram-positif se présentant sous la forme d'un diplocoque (Figure I-1) (encapsulé pour les souches pathogènes) isolée pour la première fois en 1881 de manière indépendante par 2 microbiologistes : George M. Sternberg (USA) et Louis Pasteur (France). Tandis que le premier fait usage de sa propre salive, le second utilise celle d'un enfant mort de la rage pour infecter des lapins. Pasteur et Sternberg démontrent le caractère pathogène du pneumocoque et l'identifient comme agent étiologique de pneumonies. En raison de ses caractéristiques morphologiques, le pneumocoque est nommé en 1926 *Diplococcus pneumoniae* avant d'être renommé en 1974 *Streptococcus pneumoniae*. En effet lors de sa croissance en milieu liquide le pneumocoque se présente sous forme de chaînettes (Figure I-1).

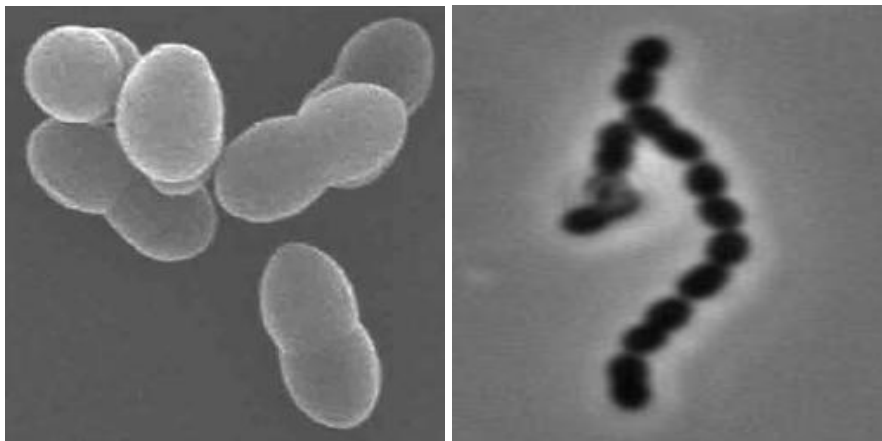


Figure I-1 : Morphologie du pneumocoque

Photo de microscopie électronique à balayage de dicoques de *S. pneumoniae* (gauche)(Le Gouellec 2008 IBS), photo de microscopie photonique d'une chaînette de *S. pneumoniae* (droite).

Le pneumocoque appartient à la division des *Firmicutes*, à la classe des *Coccus*, à l'ordre des *Lactobacillales*, à la famille des *Streptococcaceae* et au genre *Streptococcus*. Les streptocoques sont classés en 6 groupes, d'après l'analyse phylogénétique comparative des gènes codant les ARN 16S ribosomiaux (Figure I-2) : Pyogenic (comprenant entre autres *S. pyogenes* et *S. agalactiae* également appelés streptocoques du groupe A et B), Salivarius, Bovis, Mutans, Anginosus, et Mitis, ce dernier comprenant entre autres *S. pneumoniae*, *S. mitis*, *S. oralis* et *S. gordonii*. Ces membres du groupe Mitis partagent près de 99% d'identité

de séquence avec *S. pneumoniae*, faisant de ces espèces les principales sources d'ADN pour le transfert horizontal de gènes [1].

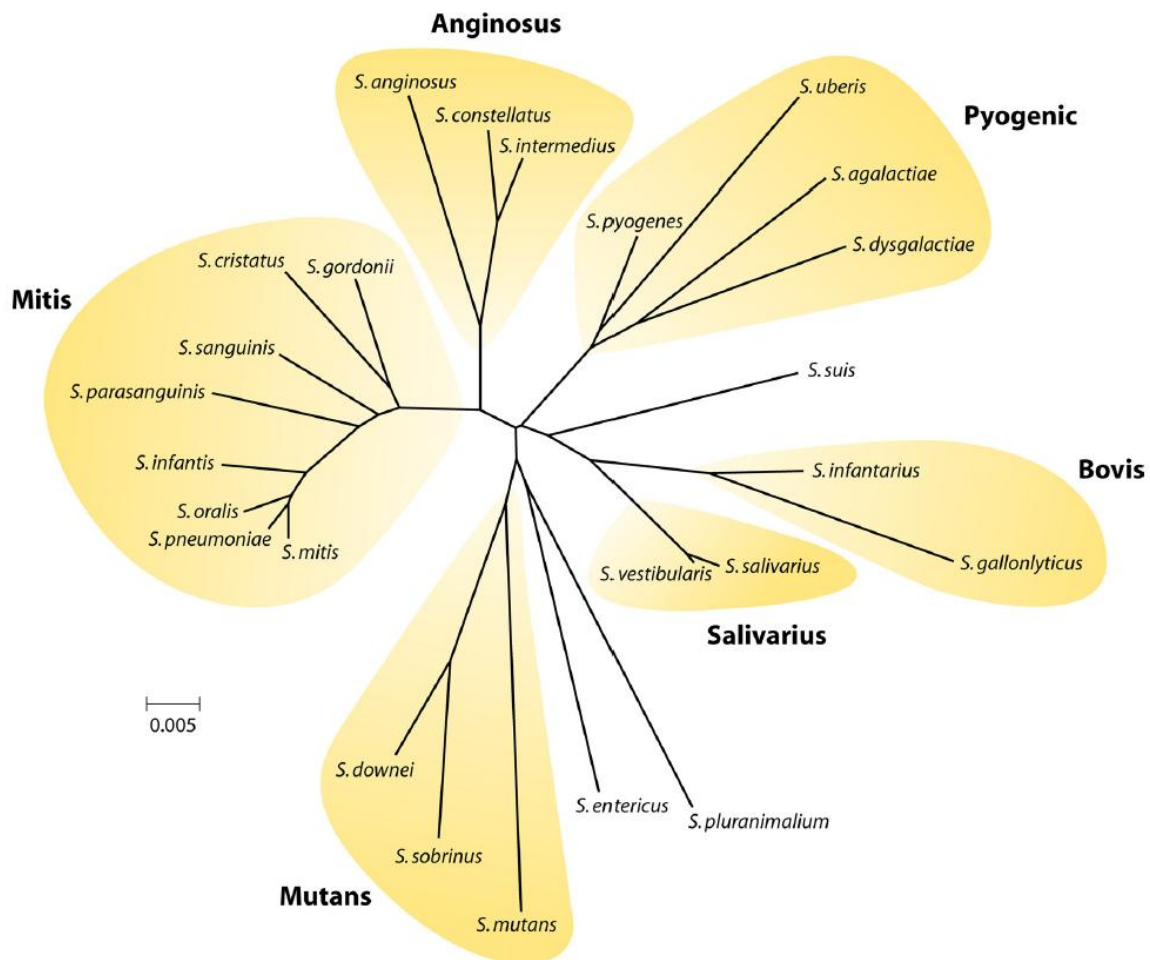


Figure I-2 : Arbre phylogénétique des streptocoques [1]

I-i-2- Epidémiologie

Le pneumocoque est un pathogène humain, responsable de plus de 1,6 millions de morts dans le monde chaque année, dont 1 million d'enfants de moins de 5 ans [2] et ce principalement dans les pays en voie de développement. De fait, il s'agit d'une des quatre principales causes de mortalité par maladie infectieuse avec le VIH, le paludisme et la tuberculose [3].

Le pneumocoque est une importante cause d'infections de la sphère ORL et pulmonaire, étant responsable de la majorité des cas de pneumonies bactériennes chez l'enfant [4] et l'adulte [5], d'otites moyennes chez l'enfant [6], de bronchites et de sinusites. *S. pneumoniae* est également la principale cause de méningites bactériennes et de septicémies [7-9]. Les infections à pneumocoque dites invasives (IPD, abréviation de l'anglais invasive

pneumococcal diseases) surviennent lorsque la migration bactérienne conduit le pneumocoque à traverser des barrières tissulaires : sont concernées les méningites et septicémies mais également les pneumonies quand les barrières sont endommagées et que des bactéries passent dans le sang. L'épidémiologie des IPD varie selon les régions. En effet, les jeunes enfants en sont principalement les victimes dans les pays en développement du fait des mauvaises conditions de vie, de la malnutrition et d'un accès difficile aux soins médicaux. Les sujets affectés dans les pays développés sont au contraire les personnes âgées ou immunodéprimées. Différents facteurs de risque sont susceptibles d'augmenter l'incidence des IPD : abus d'alcool, infections grippales, insuffisance cardiaque, diabète, asthme ou exposition à la fumée de cigarette.

Malgré la mortalité importante associée au pneumocoque, des traitements à la fois préventifs et curatifs existent. Différents vaccins sont disponibles et les infections peuvent être traitées au moyen d'antibiotiques.

1-i-3- Prophylaxie : la vaccination et ses limites

1-i-3-a- Vaccins polysaccharidiques et conjugués

Dans les pays développés, la principale mesure prophylactique actuellement employée pour contrer les infections à pneumocoques est la vaccination. La seule cible actuellement utilisable pour la production de vaccins contre le pneumocoque est la capsule, qui du fait d'un important polymorphisme dans sa composition compte actuellement 94 sérotypes différents qui représentent donc 94 antigènes capsulaires potentiels. Sur l'ensemble des sérotypes capsulaires identifiés à ce jour 20 sont responsables de 80% des IPD. La répartition des sérotypes infectieux majoritaires présente néanmoins des variations géographiques et temporelles. La production de vaccins immunisant contre l'ensemble des 94 sérotypes identifiés n'étant pas envisageable, seuls les sérotypes les plus représentés et / ou les plus infectieux sont ciblés.

Le Pneumovax® commercialisé par Merck est le premier vaccin anti-pneumocoque mis sur le marché, en 1983. Ce vaccin est composé d'un mélange de 23 antigènes capsulaires, issus des sérotypes 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8,9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F et 33F qui représentent environ 90% des IPD dans les pays développés. Toutefois ce vaccin polysaccharidique permet uniquement l'activation de lymphocytes B produisant des immunoglobulines M (IgM), insuffisantes à elles seules pour assurer une

mémoire immunologique stable et conférant très peu d'immunité mucoale. Il est destiné aux personnes âgées de plus de 65 ans ainsi qu'aux individus à risques entre 2 et 64 ans. Ce vaccin a prouvé son efficacité chez les jeunes adultes et les personnes âgées chez lesquels il confère une protection de 60-80% contre les IPD. Son efficacité est cependant amoindrie chez les individus immunodéprimés. Ce vaccin 23-valent est également peu immunogénique chez l'enfant de moins de 2 ans dont le système immunitaire est immature. C'est pourquoi le vaccin conjugué Prevenar® est mis sur le marché aux États-Unis en 2000 par Wyeth. Initialement destiné aux enfants de moins de 2 ans à risque élevé d'infections invasives, son utilisation a été étendue et il s'adresse à présent à tous les enfants de moins de 2 ans ainsi qu'aux enfants à risques de 2 à 5 ans. En France les premières recommandations pour la vaccination par le Prevenar® sont émises en 2003, avec un effet décevant : seuls 44% des enfants de moins de 1 an sont vaccinés en 2004. Une deuxième campagne en 2006 s'avère plus concluante et la couverture vaccinale s'élève à 80% des enfants de moins de 1 an en 2007 [10]. Le Prevenar® couvre les 7 sérotypes identifiés, dans les années précédant sa commercialisation, comme étant les plus infectieux chez l'enfant (Figure I-3). Les sérotypes 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, et 23F représentent en effet 65 à 80% des IPD aux États-Unis et en Europe de l'ouest à la fin des années 1990. La couverture est cependant moins complète dans d'autres régions du monde, les principaux sérotypes atteignant les enfants n'étant pas systématiquement les mêmes qu'en Europe et aux USA. En 2010 Pfizer introduit sur le marché le vaccin 13-valent Prevenar 13® qui complète la protection apportée par l'ajout de 6 sérotypes émergents : 1, 3, 5, 6A, 7F, 19A. Il est comme le Prevenar® destiné à tous les enfants de moins de 2 ans et aux enfants à risque jusqu'à 5 ans, mais est également recommandé pour les plus de 65 ans depuis cette année. Contrairement au Pneumovax® qui est un vaccin polysaccharidique (composé uniquement de sucres capsulaires) le Prevenar® est un vaccin employant des glycoconjugués. Ce vaccin conjugué est produit en liant par une réaction d'amination réductrice les polysaccharides capsulaires du pneumocoque à CRM₁₉₇, un variant inactif recombinant de la toxine diphtérique servant ici d'adjuvant. Les vaccins conjugués, contrairement aux vaccins polysaccharidiques, induisent une réponse immunitaire T-dépendante. Durant cette réponse, des lymphocytes T auxiliaires sont activés. Ceux-ci coopèrent avec les lymphocytes B dans les organes lymphoïdes secondaires, pour former un centre germinatif au sein duquel les lymphocytes B subissent la maturation d'affinité et la commutation de classe, passant de la production d'IgM à celle d'IgG ou d'IgA. Ces dernières sont des immunoglobulines sécrétoires conférant une forte immunité mucoale. De plus la

réponse T-dépendante permet la mise en place d'une mémoire immunologique, par l'établissement de lymphocytes B mémoire.

I-i-3-b- Remplacement sérotypique

Depuis l'introduction du Prevenar® on observe une diminution de l'incidence des infections à pneumocoque causées par les sérotypes vaccinaux chez l'enfant et chez l'adulte (Figure I-3 A). Cette diminution est probablement liée à une réduction du portage chez les enfants vaccinés, limitant ainsi la transmission aux enfants et adultes non vaccinés [11]. En effet en France, chez les enfants âgés de 0 à 23 mois, une baisse de 32,5 % de l'incidence des IPD a été enregistrée entre 1998-2002 (32,7 cas pour 100 000) et 2007-2008 (22,1 cas pour 100 000) (Figure I-3 A). On note néanmoins une augmentation de sérotypes non vaccinaux, qualifiés de sérotypes de remplacement (Figure I-3 A) [12, 13]. Dans les autres tranches d'âge l'incidence des IPD à sérotypes non vaccinaux a fortement augmentée tandis qu'une baisse plus limitée de l'incidence des IPD à sérotypes vaccinaux est observée (Figure I-3 A). Il en résulte une augmentation globale de l'incidence des IPD : 9,2 cas pour 100 000 en 1998-2002 à 10,4 cas pour 100 000 en 2007-2008, soit une augmentation de 14%. [14]. On observe ainsi pour toutes les tranches d'âge que la couverture sérotypique globale du vaccin heptavalent a diminué de manière drastique depuis son introduction, elle est désormais de moins de 7% chez les enfants (Figure I-3 B) [10].

Bien que le Prevenar 13® récemment introduit couvre la plupart des sérotypes de remplacement (Figure I-3), il apparaît évident que l'utilisation de ce type de vaccination engendrera à terme l'émergence de nouveaux sérotypes non-vaccinaux. Seule la production d'un vaccin couvrant l'ensemble des sérotypes pourrait potentiellement empêcher définitivement le remplacement sérotypique. Or, les coûts associés à ce type de produits rendent sa production inenvisageable, et il est également à noter que de nouveaux sérotypes sont régulièrement découverts. De plus, les conséquences de l'éradication de cette bactérie commensale chez l'homme pourraient à terme favoriser la colonisation de l'organisme hôte par d'autres pathogènes. Par conséquent, il demeure nécessaire de développer de nouvelles méthodes de prévention des infections à pneumocoque. Les vaccins basés sur des protéines sont une piste intéressante car elles sont communes à un grand nombre de sérotypes et leurs séquences sont bien plus conservées que ne le sont les structures des polysaccharides capsulaires. Les principaux candidats étudiés pour ces vaccins sont des protéines exposées à la surface de la cellule bactérienne et impliquées dans la virulence du pneumocoque.

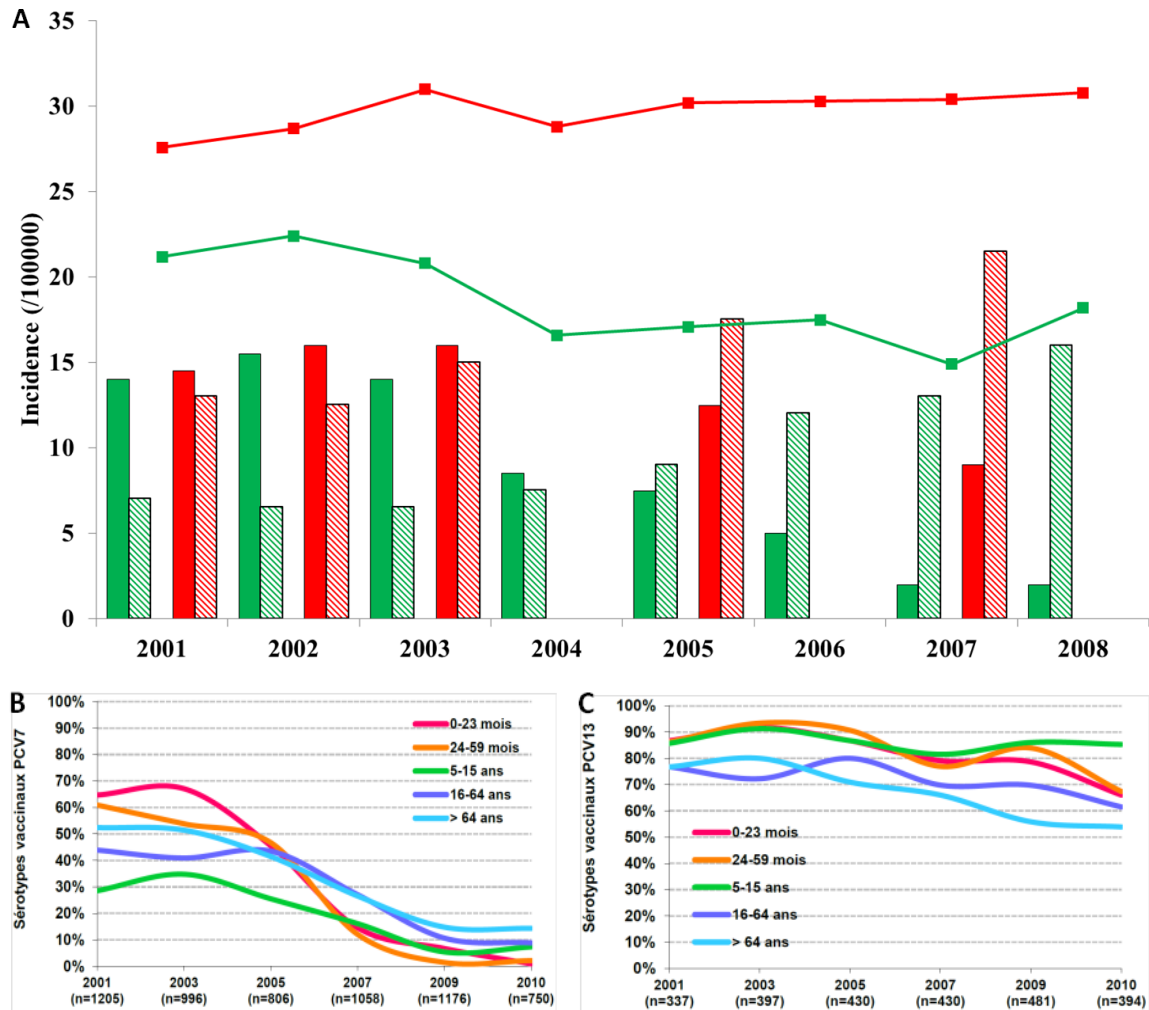


Figure I-3 : Remplacement sérotypique chez le pneumocoque

(A) Évolution des infections invasives à pneumocoque globales (courbes) et par groupes de sérotypes (histogrammes pleins pour les sérotypes vaccinaux, hachés pour les non vaccinaux), chez les jeunes enfants (0 à 23 mois, en vert) et chez les personnes âgées (>65 ans, en rouge), entre 2001 et 2008.

Évolution de la couverture sérotypique globale des vaccins 7-valent (B) et 13-valent (C) sur différentes classes de population entre 2001 et 2010.

Données extraites du rapport 2010 de F. Dorléans pour l'InVS et du rapport 2011 du CNRP.

I-i-4- Traitements antibiotiques et résistances

I-i-4-a- antibiothérapie

En 1897 en France, Ernest Duchesne démontre l'action du champignon *Penicillium glaucum* sur diverses cultures bactériennes. Dans les décennies qui suivirent ces résultats furent reproduits et étendus à d'autres espèces de moisissures et de bactéries. Il faut attendre 1928 pour qu'Alexander Fleming en Grande-Bretagne redécouvre par hasard les résultats de Duchesne, après avoir oublié dans son laboratoire une boîte de Petri contenant une culture bactérienne de *S. aureus*. À son retour, Fleming constate que la présence de *Penicillium*

glaucum a empêché la croissance de staphylocoques. Il sélectionne par la suite une souche plus efficace, qu'il nomme *P. notatum*, et en isole la pénicilline. Fleming abandonne néanmoins ses travaux à cause des difficultés de production, de purification et de l'instabilité de la pénicilline. En 1939 en Grande-Bretagne puis aux Etats-Unis, Howard Florey et Ernst Boris Chain reprennent les travaux de Fleming et parviennent à produire la pénicilline à grande échelle, à la purifier, la rendant plus stable et moins toxique. Ils sélectionnent également une nouvelle souche, *P. chrysogenum*, encore aujourd'hui à la base de la production des différentes pénicillines. Dès 1943, la production en masse de la pénicilline permet de traiter les soldats des armées alliées. Elle devient disponible en pharmacie en 1946 permettant ainsi de guérir la population des pneumonies, méningites et syphilis. C'est le début de l'âge d'or des antibiotiques qui durera jusqu'aux années 1980 et verra bien d'autres molécules être synthétisées ou découvertes chez des champignons et bactéries filamenteuses (Actinomycètes).

Les infections à pneumocoque peuvent être traitées avec la plupart des antibiotiques généralement actifs sur les bactéries Gram-positif, à l'exception notable des aminoglycosides. Le pneumocoque est ainsi sensible aux β -lactamines (pénicillines, céphalosporines), macrolides, tétracyclines, fluoroquinolones, rifamycines, glycopeptides, sulfamides, ainsi qu'au chloramphénicol et au linezolide. Le choix du traitement se fait principalement en fonction de la pathologie considérée et suivant les recommandations des autorités de santé. Le traitement de première ligne contre les pneumopathies et otites moyennes aiguës consiste généralement en la prescription d'amoxicilline (une pénicilline) tandis que pour les méningites, l'association céfotaxime (céphalosporine) et vancomycine (glycopeptide) est privilégiée. En cas d'allergies aux β -lactamines, les macrolides ou les fluoroquinolones sont le plus souvent utilisées. Ces antibiotiques inhibent différents processus essentiels à la croissance ou à la survie de la bactérie. Les β -lactamines et les glycopeptides ciblent la synthèse de la paroi bactérienne, les macrolides empêchent la synthèse protéique en se fixant aux ribosomes et les fluoroquinolones bloquent la réplication de l'ADN en inhibant la topoisomérase II.

1-i-4-b- Résistances aux antibiotiques chez le pneumocoque

On assiste cependant à l'émergence et la propagation de souches résistantes aux antibiotiques. Le premier cas de pneumocoque résistant à la pénicilline est documenté en 1967 en Nouvelle Guinée [15], et d'autres souches sont isolées durant les années 1970 en

Afrique du Sud, en Australie et en Espagne. Peu de considération est portée à la résistance aux antibiotiques chez le pneumocoque jusqu'en 1977 où l'attention de la communauté médicale est attirée par des rapports concernant des épidémies d'IPD à Durban et Johannesburg (Afrique du Sud), causées par des souches de *S. pneumoniae* hautement résistantes à la pénicilline. Les souches épidémiques alors isolées présentent également des résistances aux macrolides, à la tétracycline et au chloramphénicol [16]. Depuis lors les souches résistantes aux antibiotiques se sont largement répandues, leur émergence et leur dissémination favorisées par une consommation d'antibiotiques élevée, jusqu'à représenter dans les années 2000 plus de 50% des souches cliniques isolées comme on a pu le constater en France (Figure I-4) [11]. Les principales résistances concernent les β -lactamines et macrolides, mais des résistances à d'autres antibiotiques tels que les fluoroquinolones, tétracyclines ou au chloramphénicol sont également récurrentes. Les inquiétudes sont renforcées par le fait que l'identification de formes multi-résistantes dans des isolats cliniques est en augmentation [17]. Le terme multi-résistance décrit la perte de sensibilité à au moins 3 familles d'antibiotiques différentes dans une même souche, on considère actuellement que le taux de souches multi-résistantes est généralement de 15 à 30% [18]. Ainsi une étude menée aux États Unis entre 2004 et 2005 a mis en évidence un taux de 20% de souches multi-résistantes dans les isolats cliniques [19] et en France ce taux est de 26,5% sur la période 2009-2010 [10, 20]. Cependant des valeurs bien plus élevées peuvent parfois être observées, en 2008-2009 le taux moyen de souches multi-résistantes en Asie est de 59,3% [21]. De manière remarquable, les souches multi-résistantes isolées n'appartiennent pour la plupart qu'à quelques sérotypes : 6A, 6B, 9V, 14, 19A, 19F et 23F.

En France, les autorités prenant conscience de l'urgence de la situation et du risque représenté par l'augmentation des résistances aux antibiotiques, mettent en place en 2001 le « plan antibiotiques ». Celui-ci a pour but notamment d'améliorer la surveillance des isolats cliniques résistants et multi-résistants, en renforçant l'action des centres régionaux d'observation de plusieurs bactéries pathogènes, dont le pneumocoque. La mise en place d'actions d'information, non seulement des professionnels par le biais de l'ANSM, mais également de la population avec des spots télévisés diffusant le célèbre slogan « Les antibiotiques, c'est pas automatique » marquent les esprits. Alors qu'en 2001, 51% des isolats cliniques de pneumocoque montrent une sensibilité diminuée à la pénicilline, ce pourcentage chute à 30% en 2010 (Figure I-4). Malgré ces efforts, le taux de résistance global envers tout type d'antibiotique reste élevé [10].

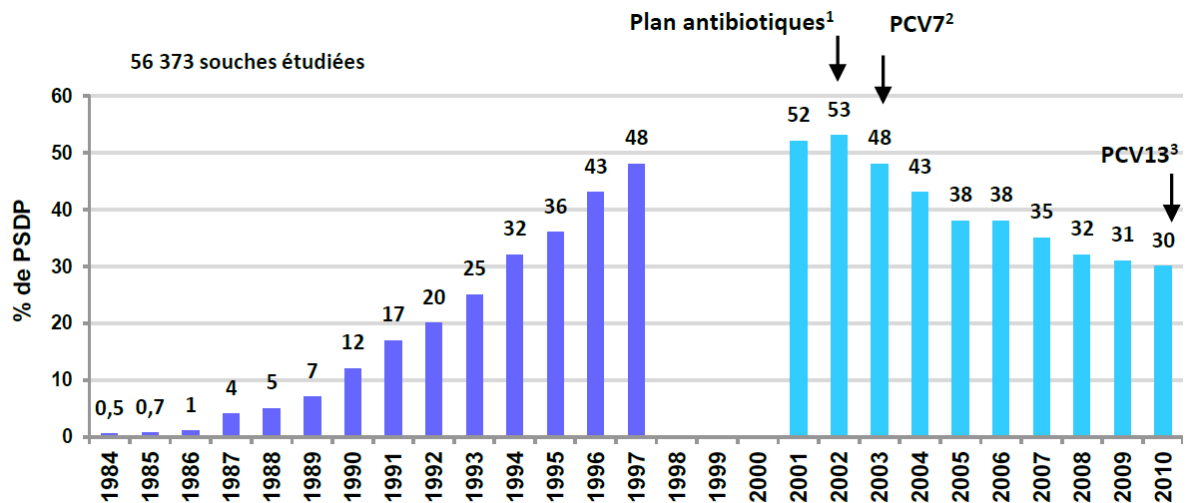


Figure I-4 : Evolution des PSDP en France sur la période 1984-2010

PSDP : Pneumocoques de Sensibilité Diminuée à la Pénicilline. ¹Plan national pour préserver l'efficacité des antibiotiques, ²Introduction du vaccin 7-valent, ³Introduction du vaccin 13-valent. Données extraites du rapport 2011 du CNRP.

I-ii- Commensalisme

Le commensalisme est un type d'interaction biologique naturelle assez commune entre deux organismes vivants où l'une des espèces (le commensal) retire des bénéfices de l'association sans que l'autre (l'hôte) ne soit ni aidée, ni handicapée. Le commensalisme diffère d'autres types de relations tels que le mutualisme, qui est une association bénéfique pour les deux partenaires, ou le parasitisme où l'un des deux organismes (le parasite) se développe aux dépens de l'autre (l'hôte). Le terme de flore commensale humaine regroupe toutes les bactéries, protozoaires et mycètes vivant sur un être humain en bonne santé. Les principales zones de colonisation sont la peau, la cavité buccale, les voies respiratoires supérieures, les appareils gastro-intestinal inférieur et urogénital. Environ 10^{14} bactéries vivent dans le seul tube digestif, ce qui représente un nombre 10 fois plus grand que l'ensemble des cellules du corps humain. De nombreuses bactéries considérées comme membres de la flore commensale humaine peuvent potentiellement établir des relations mutualistes ou même pathogéniques avec leur hôte.

Bien qu'étant un important pathogène humain, *S. pneumoniae* fait partie de la flore commensale et colonise de manière asymptomatique la surface de la muqueuse dans la sphère oro-pharyngée. Les pathologies à pneumocoque ne facilitent pas la dissémination de la bactérie à de nouveaux hôtes mais ont en fait un coût biologique en réduisant les opportunités de transmission, qui dépend essentiellement des contacts directs avec les porteurs sains via les sécrétions respiratoires. Cette phase de portage transitoire pouvant se prolonger dans le temps (de quelques semaines à plusieurs mois) avant que le pneumocoque ne soit finalement éliminé par le système immunitaire [22] est un prérequis à l'apparition d'infections [23]. Les pathologies se déclenchent en effet quand les bactéries accèdent depuis les voies respiratoires supérieures à des espaces normalement stériles tels que l'oreille moyenne, les poumons, le sang ou le liquide céphalo-rachidien (LCR). La colonisation successive et/ou simultanée par différentes souches est fréquente. Les taux de portage les plus élevés (généralement compris entre 30 et 50%, jusqu'à 70% dans certaines populations en Inde) sont observés chez les enfants avant 2 ans (la colonisation par le pneumocoque peut débuter dès le troisième mois de vie) et diminuent ensuite [24]. Durant cette phase asymptomatique le pneumocoque est confronté à différents défis et doit, afin de coloniser efficacement son hôte, mettre en place des mécanismes lui permettant de survivre et de proliférer en s'adaptant aux contraintes de son environnement.

Les différents « mécanismes » impliqués dans la colonisation sont présentés ci-dessous. La colonisation implique également d'échapper à la surveillance immunitaire de l'hôte. Les mécanismes moléculaires mis en jeu seront détaillés plus loin dans ce manuscrit.

I-ii-1- Compétition et synergie

I-ii-1-a- Compétition entre espèces bactériennes

Pendant la colonisation le pneumocoque entre en compétition avec d'autres bactéries occupant également le nasopharynx (telles que *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus mitis* ou *Streptococcus oralis*) et met en œuvre divers moyens pour les éliminer. Il est ainsi capable de produire des quantités importantes de peroxyde d'hydrogène (autant d'H₂O₂ produit par gramme de protéines cellulaires que les neutrophiles durant leur explosion oxydative), auquel il est lui-même particulièrement résistant, grâce à sa pyruvate oxydase (SpxB). Cette production d'H₂O₂ permet au pneumocoque de détruire certains compétiteurs tels que *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *N. meningitidis* [25, 26]. L'effet du peroxyde d'hydrogène sur *S. aureus* est par contre contesté [27]. Le pneumocoque exprime également des neuraminidases (NanA et NanB) [28, 29] pouvant cliver les acides sialiques. L'action de ces enzymes sur les lipopolysaccharides de *N. meningitidis* et *H. influenza* rend ces bactéries plus susceptibles à l'élimination par le système du complément [30-32]. Cette compétition entre espèces bactériennes peut également se faire au détriment du pneumocoque. En effet, des études ont montrées que la co-colonisation avec *H. influenza* peut conduire à l'élimination de *S. pneumoniae* par une réponse phagocytaire dépendante du complément et du recrutement de neutrophiles, et augmente la réponse inflammatoire [33]. Cette compétition avec *H. influenza* peut cependant sélectionner des sérotypes de pneumocoques plus résistants à l'opsonophagocytose, favorisant ainsi l'échappement du pneumocoque au système immunitaire [34].

Au-delà de la compétition inter-espèces, une compétition intra-espèce peut également se produire. Les pneumocoques expriment des bactériocines de classe IIb (pneumocines) qui ciblent d'autres pneumocoques, ou des bactéries d'espèces plus ou moins proches (*S. oralis*, *S. pyogenes*, *S. mitis*, *Streptococcus salivarius*, *Micrococcus luteus*, *Lactococcus lactis*), ne présentant pas le facteur d'immunité associé [35]. Les pneumocines sont composées de deux peptides indépendants, de 20 à 60 acides aminés de long, cationiques et hydrophobes, et agissent en perméabilisant les membranes de la cible par la formation de pores [36]. Les

pneumocines et facteurs d'immunité sont codés par le locus *blp* et régulés par un système à 2 composantes (SpiR2/H) répondant, grâce au régulateur de réponse SpiR1, à une phéromone de quorum sensing SpiP. L'export des pneumocines lors de leur synthèse est assuré par un transporteur ABC, SpiABCD qui est lui aussi codé par le locus *blp* [37, 38]. Ce locus est l'une des zones les plus hétérogènes du génome, ce qui explique la grande variété de pneumocines et de facteurs d'immunité. Cette variabilité, et la nécessité associée pour le pneumocoque d'acquérir des facteurs d'immunité afin de se protéger, pourraient en partie s'expliquer par l'importante capacité du pneumocoque à s'adapter par transfert horizontal de gènes.

I-ii-1-b- Synergies pneumocoque / virus

Il a longtemps été supposé que les infections virales de l'appareil respiratoire prédisposent aux surinfections bactériennes, notamment suite à l'altération de l'épithélium respiratoire [39]. Ainsi la majorité des morts durant les pandémies grippales est due à des infections bactériennes, donc *S. pneumoniae* est l'une des principales causes [40]. Des études récentes dans des modèles animaux ont montré que, en cas d'infection par le virus de la grippe A, la co-infection ou la surinfection par le pneumocoque produit une infection bactérienne plus grave qu'en cas d'infection par le pneumocoque seul [41, 42]. On observe également que le portage du pneumocoque est plus souvent détecté chez des patients atteints d'infections virales que chez les individus sains, la colonisation bactérienne étant donc favorisée par les infections virales des voies respiratoires [43, 44]. Les processus de colonisation et d'invasion par le pneumocoque peuvent ainsi être favorisés par la présence de virus, tels que celui de la grippe A, qui potentialisent l'adhésion, la colonisation et l'infection bactérienne [39, 45]. L'importance médicale de ce phénomène est telle que la vaccination anti-pneumococcique (Prevenar 13®) est maintenant conseillée en même temps que la vaccination antigrippale chez les personnes âgées.

I-ii-2- Compétence

I-ii-2-a- Découverte de la compétence

S. pneumoniae présente une propriété de compétence naturelle, définie par Dubnau comme un état physiologique génétiquement programmé permettant l'absorption efficace d'ADN macromoléculaire [46]. Cette propriété lui confère une importante capacité d'adaptation, par l'accès à un large réservoir de gènes partagés entre les différentes souches de pneumocoques et les espèces proches telles que *S. mitis* et *S. oralis* (Figure I). Le phénomène de transformation bactérienne est mis en évidence pour la première fois par Griffith en 1928, qui

décrit des souches de pneumocoque R (Rough) et S (Smooth) et compare leur pouvoir pathogène [47]. En effet, lorsque le pneumocoque est cultivé sur une gélose supplémentée en sang, les colonies apparaissent sous deux formes : une forme lisse S pour les bactéries encapsulées et une forme rugueuse R pour les bactéries dépourvues de capsule. Chez la souris, seules les colonies S sont létales, entraînant la mort par septicémie 24 à 48 heures après injection intrapéritonéale. Griffith observe que des bactéries de type S préalablement tuées par la chaleur perdent leurs propriétés virulentes lorsqu'elles sont injectées à des souris. En revanche, lorsque ces bactéries S préalablement chauffées sont injectées conjointement avec des bactéries R vivantes, les souris meurent par septicémie. Les bactéries R ont donc acquis un caractère pathogène au contact de bactéries S inactivées. Ce phénomène appelé transformation bactérienne a par la suite été reproduit chez plusieurs autres espèces de bactéries. Griffith en déduit également qu'il doit exister un « facteur transformant » probablement libéré par la chaleur et susceptible d'être intégré par d'autres bactéries, leur conférant ainsi de nouvelles propriétés. Ce n'est qu'en 1944 que Avery, McLeod et McCarthy déterminent la nature biochimique de ce « facteur transformant » : l'ADN, et démontrent par là même sa fonction de support de l'hérédité [48].

I-ii-2-b- Mécanisme de la compétence chez le pneumocoque

Ce phénomène de compétence, très étudié chez le pneumocoque depuis cette découverte, peut être divisé en plusieurs phases: l'induction du système de compétence, la liaison de l'ADN double brin exogène à la surface cellulaire, suivie de la digestion de l'ADN double brin, puis l'import d'ADN linéaire simple brin et enfin la recombinaison des séquences homologues dans le chromosome.

L'induction de ce mécanisme est contrôlée par un système de quorum sensing codé par les gènes *comABCDE*. Le gène *comC* code une phéromone dite CSP (competence-stimulating peptide) [49], les gènes *comAB* codent pour l'appareil de sécrétion du CSP [50], et les gènes *comDE* codent pour des protéines impliquées dans un système à 2 composantes sensible à la concentration extracellulaire de CSP [51]. Au-delà d'un simple rôle de phéromone de quorum sensing (s'accumulant de manière passive et dont la concentration est uniquement dépendante de la densité cellulaire), l'expression du CSP répond également aux changements métaboliques et plus généralement, aux changements de conditions environnementales (concentrations d'acides aminés, altération du métabolisme des purines, de la composition lipidique de la membrane ou de la synthèse du peptidoglycane) [52-54]. Quand la

concentration de CSP atteint un niveau critique, ComD (une histidine kinase membranaire faisant office de récepteur du CSP) active par phosphorylation son régulateur de réponse partenaire, ComE. Les cellules entrent dans l'état de compétence sous l'effet de ComE qui initie la transcription d'une vingtaine de gènes de compétence précoces, en se liant à un motif constitué d'une répétition imparfaite de 9 paires de bases séparée par 12 nucléotides dans la région promotrice des gènes cibles [55]. Parmi ces gènes *comX* code pour un facteur sigma alternatif requis pour l'expression d'environ 80 gènes de compétence tardifs [56, 57] (Figure I-5a).

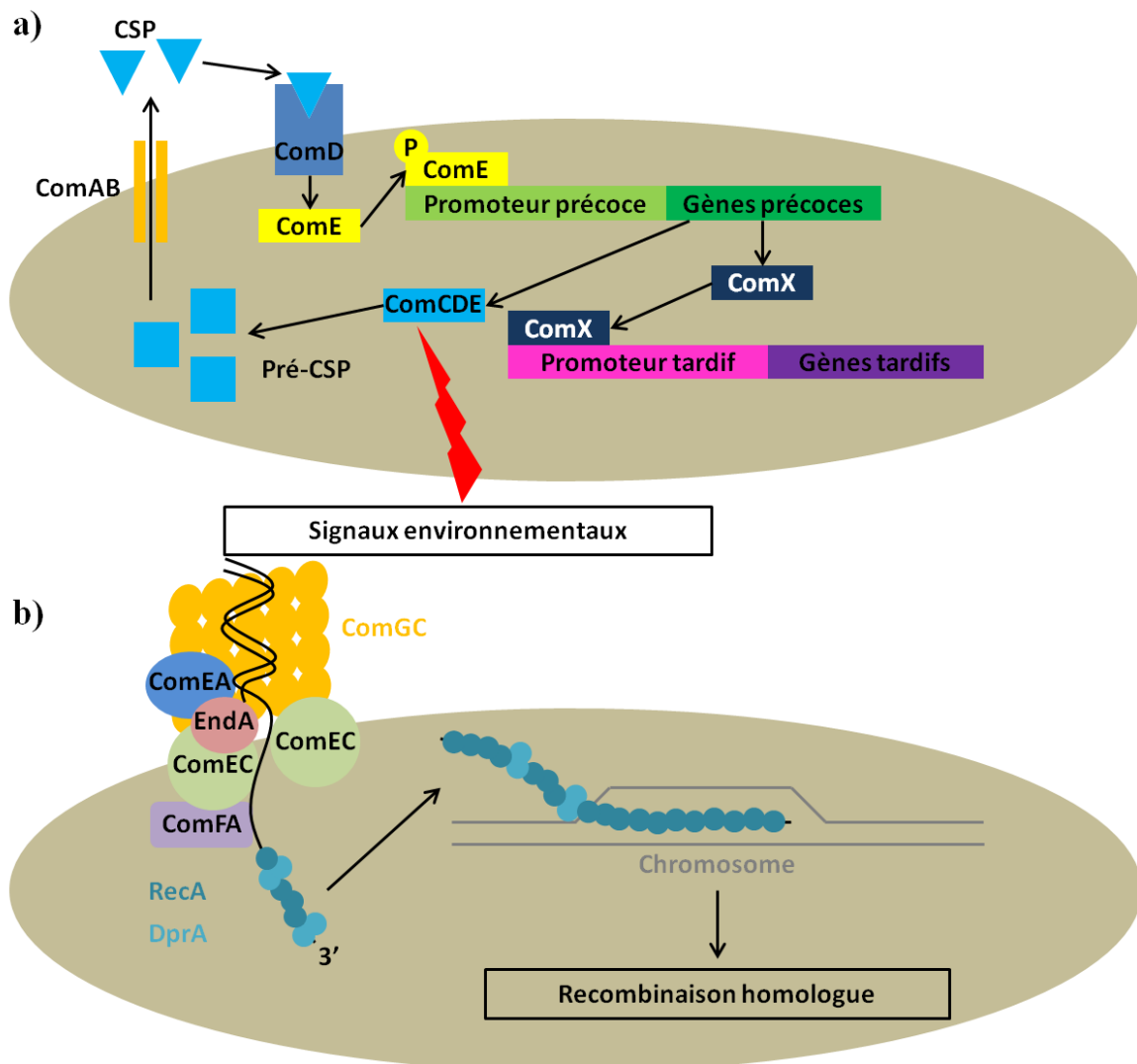


Figure I-5 : Mécanisme de la compétence chez le pneumocoque

Représentation schématique de la régulation de la compétence (a) et des mécanismes de transport et de maturation de l'ADN recombinant (b).

Les bactéries compétentes sont alors capables d'acquérir de l'ADN exogène double brin qui est dans un premier temps recruté par un pilus de transformation, de structure semblable aux pili de type IV, pouvant atteindre 2 à 3 μm de long. Ce pilus est formé principalement par la polymérisation de ComGC, une protéine codée par un gène de compétence tardif de l'opéron *comG* [58]. L'un des 2 brins de l'ADN transformant est importé dans la cellule à travers un pore formé par ComEC, avec une polarité d'entrée 3' \rightarrow 5', l'énergie étant fournie par la translocase ComFA. De manière concomitante à l'internalisation d'un brin, l'autre est dégradé par la nucléase membranaire EndA (exprimée constitutivement) avec le concours de ComEA, une protéine capable de fixer l'ADN qui présente le double brin à EndA (Figure I-5b) [59]. Après avoir été internalisé, la majorité de l'ADN est dégradé dans la cellule [60], une partie est cependant protégée par les protéines DprA et RecA (appartenant au régulon de la compétence) [61]. DprA lie l'ADN simple brin et forme un homodimère, qui permet le recrutement et la polymérisation de RecA [62, 63]. Le nucléofilament mixte ADN-DprA-RecA catalyse très efficacement la formation de jonctions hétéroduplex entre molécules simple-brin (ADN transformant) et double-brin (ADN génomique), permettant l'intégration dans le génome de l'ADN transformant par recombinaison homologue (Figure I-5b).

I-ii-2-c- Intérêt de la compétence pour le pneumocoque

Outre l'acquisition de pneumocines mentionné précédemment, ce mécanisme de compétence permet par exemple le changement de sérotype capsulaire par la modification du locus *cps* (responsable de la biosynthèse de la capsule) [64, 65] ou l'intégration de mutations ou de nouveaux gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques. Dans le cas des β -lactamines c'est la recombinaison des gènes codant pour des protéines liant la pénicilline (PBP pour Penicillin Binding Proteins) du pneumocoque avec ceux provenant d'espèces proches qui conduit à la création de PBP dites mosaïques, d'affinité réduite pour les antibiotiques [66-68]. La compétence naturelle du pneumocoque permet également de corriger les mutations délétères induites par l'accumulation de peroxyde d'hydrogène. Outre son implication dans le transfert horizontal de gènes, ce mécanisme participe également à la compétition intra- et inter-espèces en permettant au pneumocoque de lyser les bactéries non compétentes. Sur la centaine de gènes répondant au CSP, seule une vingtaine est requise lors des étapes de transformation [69]. Un certain nombre d'autres gènes est impliqué dans le phénomène de fratricide microbien : les cellules compétentes acquièrent la capacité de lyser les cellules non compétentes, non seulement chez le pneumocoque mais aussi chez des espèces proches (ex. *S. mitis*, *S. oralis*). Ce phénomène d'allolyse met en jeu le produit d'au

moins six gènes du régulon de la compétence : les gènes *cbpD* et *lytA* (dont l'expression constitutive est augmentée dans les cellules compétentes) codent pour des enzymes lytiques (amidases), les gènes *cibA* et *cibB* codent pour une bactériocine à deux composants, et les gènes *comM* et *cibC* confèrent aux cellules compétentes une immunité vis-à-vis respectivement des enzymes lytiques et de CibAB [70-72]. L'allolyse est très vraisemblablement aussi à l'origine de la libération d'ADN qui requiert l'intervention du lysozyme LytC (exprimée constitutivement et qui ne fait pas partie du régulon de la compétence) [73]. Il est à noter que la présence de LytA et LytC chez l'un des deux partenaires (soit les cellules compétentes, soit les cellules cibles non-compétentes) est suffisante pour aboutir au fratricide. Cette observation implique l'existence d'un mécanisme d'activation des enzymes lytiques des cellules cibles, probablement par CbpD.

I-ii-3- Métabolisme et synthèse des sucres

Durant la phase de colonisation le pneumocoque doit également adapter son métabolisme à un environnement pauvre en nutriments aisément métabolisables. Le génome du pneumocoque code ainsi pour une variété d'enzymes extracellulaires (ex : NanA, NanB, NanC, StrH, BgaA, EndoD, SpuA, SpGH101) lui permettant de dégrader les mucines, glycolipides et acides hyaluroniques de l'hôte, augmentant la disponibilité de substrats grâce à leurs activités variées : N-acétylglucosaminidases, α - et β -galactosidases, endoglycosidases, hydrolases, hyaluronidases, neuraminidases [74, 75]. Le pneumocoque est également particulièrement bien équipé pour le transport des sucres, l'analyse de son génome prédit l'existence de 21 enzymes II du système de phosphotransférase des sucres (PTS pour phosphotransferase system). L'enzyme II du PTS est responsable de la phosphorylation des sucres, pré-requis indispensable à leur transport par le complexe PTS. Le grand nombre d'enzymes II chez le pneumocoque suggère une capacité à transporter une très grande variété de sucres. Rapporté à la taille du génome, le pneumocoque code 2 fois plus d'enzymes II que n'importe quel autre organisme séquencé (à l'exclusion des autres streptocoques) [76, 77], ce qui met en exergue l'aspect crucial du métabolisme des sucres pour le pneumocoque.

En parallèle, le pneumocoque doit protéger ses propres polysaccharides de surface, et plus particulièrement son peptidoglycane. La muqueuse respiratoire humaine contient en effet une grande quantité de lysozyme qui hydrolyse les liaisons covalentes (β 1 \rightarrow 4 glucosidique) entre l'acide N-acétylmuramique avec le 4^e atome de carbone du N-acétylglucosamine du peptidoglycane. Les mécanismes de défense du pneumocoque consistent en l'expression de 2

enzymes, PgdA et Adr (respectivement une N-acétylglucosamine déacétylase et une O-acétyltransférase) qui, en modifiant le peptidoglycane, le rendent résistant à l'hydrolyse par le lysozyme [78].

I-ii-4- Adhésion à la muqueuse

S. pneumoniae doit se fixer efficacement à la muqueuse respiratoire afin de ne pas être expulsé mécaniquement par l'action notamment du mucus, l'interaction du pneumocoque avec les tissus épithéliaux est donc particulièrement importante lors de la colonisation [79-81]. Différentes protéines dont les fonctions seront détaillées plus loin dans ce manuscrit permettent au pneumocoque d'adhérer aux tissus durant la colonisation, mais sont également liées au processus pathogénique.

Il est à noter qu'il existe une hétérogénéité morphologique chez *S. pneumoniae*, qui se présente à la fois sous forme de dicoques et de chaînes plus ou moins longues. Bien que les chaînes activent plus facilement le complément et sont plus sensibles à la phagocytose [82], elles favorisent également l'adhésion aux cellules épithéliales [83]. Il est donc possible que cette hétérogénéité de forme soit régulée afin de favoriser l'adhésion lors de la colonisation du nasopharynx tout en protégeant les bactéries vis-à-vis du système immunitaire.

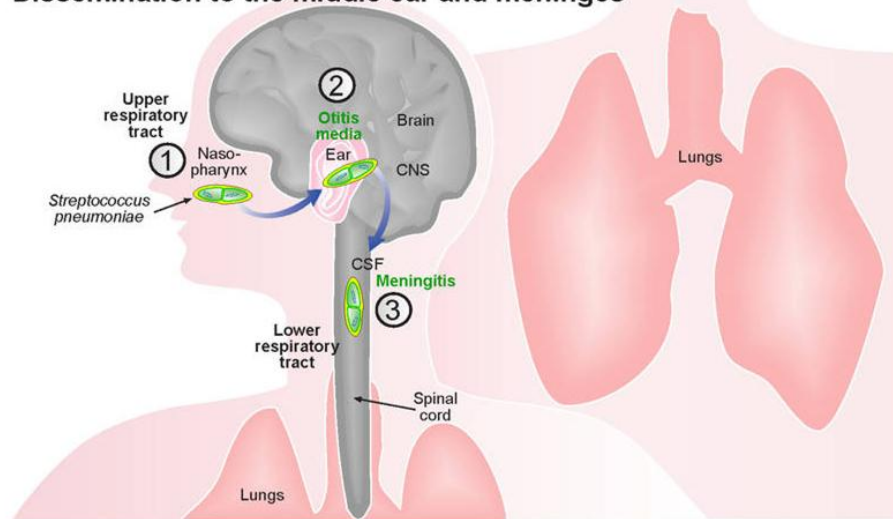
La modulation de l'épaisseur de la capsule semble également jouer un rôle dans la modulation du pouvoir adhésif du pneumocoque. Des études montrent que des souches non-encapsulées présentent une meilleure adhérence aux cellules épithéliales A549 *in vitro* que les souches isogéniques exprimant une capsule, qui elles-mêmes subissent une réduction de la quantité de polysaccharides capsulaires lorsqu'elles entrent en contact avec les cellules humaines [84]. L'accroissement de l'adhésion, observée lorsque la capsule est moins épaisse ou absente, est probablement à mettre en relation avec une meilleure accessibilité des adhésines protéiques sous-jacentes. La présence de la capsule est néanmoins nécessaire car elle permet de limiter l'élimination par le mucus [85], probablement par un mécanisme de répulsion électrostatique, et de résister à la pression du système immunitaire durant la colonisation. D'autre part, en comparaison avec des isolats provenant du sang, les pneumocoques isolés du nasopharynx produisent une capsule moins épaisse et forment plus facilement des biofilms qui favorisent la colonisation [86]. Ces données suggèrent par ailleurs que la synthèse de la capsule doit pouvoir être régulée en réponse à une modification de l'environnement dans lequel se trouve la bactérie. Ces questions sont complexes et à l'heure actuelle peu d'éléments de réponse sont connus.

I-iii- Transition entre colonisation et infection

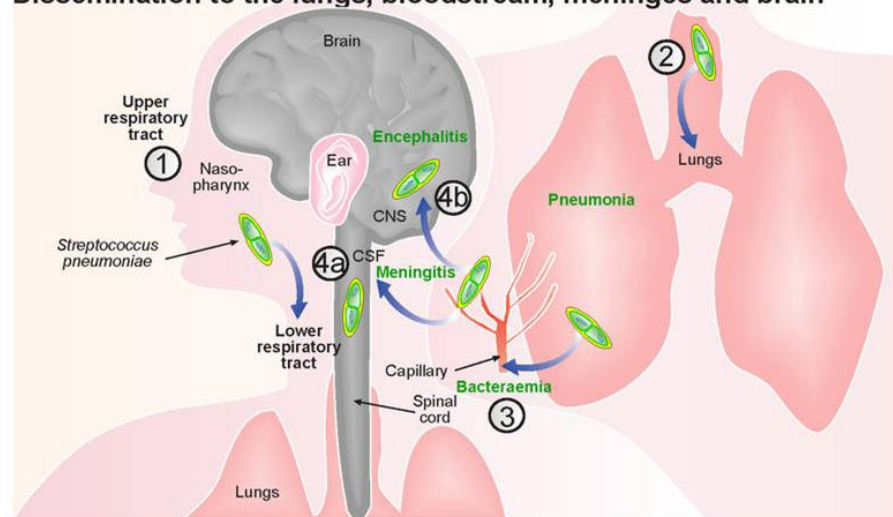
Lorsqu'il devient pathogène, le pneumocoque envahit certains tissus stériles (oreille moyenne, poumons, sang...) qui lui sont accessibles depuis le nasopharynx qu'il a colonisé. Différentes voies de dissémination dans l'organisme de l'hôte sont connues. L'une des voies les plus communes, en particulier chez l'enfant, passe par l'ascension de la trompe d'Eustache depuis le nasopharynx vers l'oreille moyenne, conduisant à une otite moyenne aiguë [87]. Une infection prolongée de ce compartiment permet l'invasion du LCR par les sinus mastoïdes, causant une méningite [87]. L'autre voie commune de dissémination, en particulier chez l'adulte, est l'invasion des poumons causant une pneumonie. L'inflammation des poumons et la destruction de l'épithélium pulmonaire peuvent alors permettre le passage de bactéries dans le flux sanguin. Cette bactériémie, si elle s'accompagne d'un syndrome de réponse inflammatoire systémique, devient par la suite une septicémie. La présence de pneumocoques dans le sang peut aussi conduire à l'invasion du LCR par les capillaires traversant le plexus choroïde ou par l'espace sous-arachnoïdien, causant une méningite [87]. Des bactéries peuvent, bien que plus rarement, traverser la barrière hémato-encéphalique et atteindre le système nerveux central, causant une encéphalite bactérienne. Enfin, une voie alternative passe par la translocation de bactéries à travers l'épithélium du nasopharynx. Les pneumocoques ainsi présents dans la sous-muqueuse peuvent alors traverser l'endothélium vasculaire des capillaires sanguins par translocation, causant une bactériémie pouvant avoir les mêmes évolutions que celles précédemment décrites (Figure I-6) [87]. Il apparaît ainsi que les voies permettant la dissémination de *S. pneumoniae* sont diverses, mais elles nécessitent toutes un mécanisme centrale pour la virulence du pneumocoque : la traversée des barrières épithéliales et / ou endothéliales.

Les mécanismes moléculaires permettant la transition du pneumocoque entre un état commensal des voies respiratoires supérieures et un statut d'agent pathogène envahissant les tissus stériles sont actuellement mal connus. On remarque cependant que le pneumocoque ne devient généralement pathogène que chez des individus au système immunitaire immature (enfant avant 2 ans) ou déficient (personnes âgées, immunodéprimées). L'établissement d'une infection requiert donc probablement la rupture d'un équilibre, entre d'un côté la réponse immunitaire de l'hôte, et de l'autre les facteurs de virulence dont dispose le pneumocoque pour assurer l'invasion tissulaire et l'échappement au système immunitaire.

a) Dissemination to the middle ear and meninges



b) Dissemination to the lungs, bloodstream, meninges and brain



c) Dissemination to the bloodstream, meninges and brain

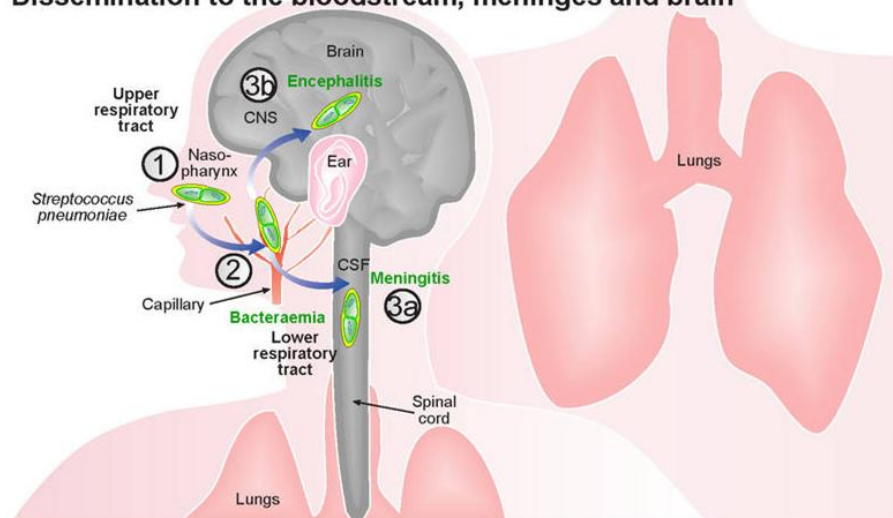


Figure I-6 : Principales voies d'invasion du pneumocoque [87]

a) Dissémination du pneumocoque depuis le nasopharynx (1) vers l'oreille moyenne (2) puis dans le LCR (3), courant chez l'enfant ; b) dissémination depuis le nasopharynx (1) vers les poumons (2) suivi du passage dans le sang (3) puis dans le LCR (4a) et les méninges (4b), également courant ; c) plus rarement passage dans le sang à travers l'épithélium du nasopharynx (1 → 2) puis dans le LCR (4a) et les méninges (4b).

I-iv- Réponse immunitaire au pneumocoque

L'entrée du pneumocoque dans l'organisme induit une réponse rapide du système immunitaire puisque 1 à 3 jours après l'initiation de la colonisation chez la souris, on observe un influx de neutrophiles qui phagocytent les pneumocoques dans le nasopharynx [88]. Cependant cette réponse inflammatoire aigüe n'est pas efficace pour éliminer le portage et le pneumocoque persiste même après la résolution de l'infiltrat de neutrophiles. Une réponse plus complexe et plus longue (plusieurs semaines ou mois), impliquant le recrutement graduel de monocytes / macrophages, est nécessaire pour éliminer le pneumocoque du nasopharynx [89]. Les acteurs cellulaires et humoraux impliqués dans la réponse immune face à la colonisation ou à l'infection sont globalement identiques, l'infection se caractérise cependant par une réponse inflammatoire plus importante et systémique.

La première phase de la réponse immunitaire repose sur des éléments du système immunitaire inné, à la fois cellulaires et humoraux, dont dépend le développement de la réponse adaptative. En effet, certains phagocytes impliqués dans la réponse innée (macrophages, cellules dendritiques) sont des cellules présentatrices d'antigène (CPA) qui, après avoir phagocyté des bactéries, vont migrer vers les organes lymphoïdes secondaires afin d'y activer les lymphocytes B et T. Cette activation est modulée par les cytokines produites par les CPA, dont l'expression dépend elle-même de la manière dont les cellules ont préalablement reconnu les bactéries : récepteurs impliqués, environnement local (chimiokines, anaphylatoxines...).

I-iv-1- Réponse immunitaire innée au pneumocoque

I-iv-1-a- Acteurs cellulaires de la réponse innée au pneumocoque

La réponse cellulaire innée au pneumocoque repose sur des neutrophiles, monocytes / macrophages et cellules dendritiques qui sont recrutés pour phagocyter les bactéries. L'action des neutrophiles est cruciale pour assurer l'élimination du pneumocoque par phagocytose, et nécessite qu'ils soient activés par un environnement cytokinique propice [90]. Les macrophages et cellules dendritiques sont également essentiels pour coordonner la réponse immunitaire innée en fournissant l'environnement cytokinique nécessaire aux neutrophiles [91, 92].

Outre la phagocytose, les neutrophiles disposent également d'un autre moyen pour éliminer les pathogènes. En 2004 Zuchlinsky et son groupe démontrent que les neutrophiles

peuvent déclencher un processus de mort cellulaire dépendant de la NADPH oxydase qui conduit au relargage de leur ADN, auquel se lient des protéines ayant des activités antimicrobiennes telles que des histones ou des protéases [93]. Ce mécanisme est appelé piège extracellulaire du neutrophile (NET pour Neutrophil Extracellular Trap). Lors d'infections respiratoires à pneumocoque chez la souris des NET sont formés et capturent les pneumocoques [94]. Néanmoins, contrairement à d'autres bactéries comme les *Shigella*, le pneumocoque n'est pas tué par les constituants du NET.

I-iv-1-b- Mécanisme de la phagocytose

Parmi les mécanismes de l'immunité innée permettant l'élimination des pathogènes dont le pneumocoque, l'un des plus importants est sans conteste le processus de phagocytose. C'est à Metchnikoff que l'on doit en 1882 la première description de cellules capables d'incorporer dans leur cytoplasme des particules et de les digérer, phénomène qu'il découvre en observant au microscope la réaction de certaines cellules d'une larve d'étoile de mer à l'introduction de morceaux d'épine. Il nomme ces cellules « phagocytes » et attribue à leur activité un rôle capital dans les processus de défense contre les agressions microbiennes.

Le processus de phagocytose implique différentes étapes et est initié par l'établissement d'un contact entre la surface de la cellule phagocytaire et celle de la particule qu'elle va ingérer. Des liaisons se forment entre les glycoprotéines membranaires des phagocytes et des structures de surface du corps étranger. L'adhésion est aussi facilitée par l'opsonisation des corps étrangers. La liaison d'un micro-organisme ou de toute autre particule à un récepteur phagocytaire entraîne une cascade de signalisation, régulée principalement par des processus de phosphorylation. Cette signalisation résulte en de profonds remaniements du cytosquelette cellulaire, avec accumulation de F-actine sous la membrane plasmique. Cette accumulation d'actine conduit à la formation de pseudopodes qui entourent la particule, formant *in fine* une nouvelle vacuole intracellulaire, le phagosome. À l'intérieur de ce phagosome la particule est finalement digérée par l'accolement et à la fusion des lysosomes avec la membrane du phagosome. Le phagolysosome ainsi formé contient divers enzymes tels que des protéases qui vont, selon leur spécificité, s'attaquer aux divers constituants de la particule ou du micro-organisme.

La phagocytose s'accompagne le plus souvent d'une brutale élévation de la consommation cellulaire en oxygène, appelée burst oxydatif. En effet, la liaison d'une particule exogène active la NADPH oxydase, qui transfère des électrons du NADPH à

l'oxygène moléculaire. Les espèces réactives de l'oxygène (H_2O_2 , $OH\cdot$ et $O_2\cdot^-$) se retrouvent en forte concentration dans le phagolysosome, où ils exercent des effets toxiques sur les micro-organismes phagocytés en endommageant divers constituants (ADN, protéines, lipides). La NADPH oxydase transporte aussi des protons, conduisant à l'acidification du phagosome qui tue divers micro-organismes et est également importante pour l'action des protéases. De plus, certains macrophages sont capables après induction d'une NO synthase de produire des dérivés nitrés, notamment le monoxyde d'azote, par oxydation des noyaux azotés de la L-arginine. Le monoxyde d'azote réagit avec les ions superoxyde ($O_2\cdot^-$) formant des espèces réactive de l'azote elles aussi dommageables aux micro-organismes phagocytés [95]. Néanmoins certaines bactéries telles que *Listeria monocytogenes* ou *Legionella pneumophila* sont capables de résister à la phagocytose et de se multiplier dans le cytoplasme du phagocyte (*L. monocytogenes* désorganise la membrane du phagosome pour y échapper) ou dans une vacuole (*L. pneumophila* inhibe la fusion phagosome-lysosome en recrutant du réticulum endoplasmique).

I-iv-1-c- Récepteurs cellulaires reconnaissant le pneumocoque

La reconnaissance directe des pneumocoques par les cellules phagocytaires fait intervenir un ensemble de molécules du système immunitaire inné, des récepteurs de surface appelés PRR (pattern recognition receptors), qui reconnaissent des PAMP (pathogen-associated molecular patterns) présents à la surface des bactéries et permettent la phagocytose des bactéries (Figure I-7).

SIGN-R1, un récepteur lectine type C exprimé par les macrophages, est impliqué dans la reconnaissance de la capsule de plusieurs sérotypes de pneumocoques [96]. Des souris KO (knockout, inactivation des 2 allèles d'un gène donné) SIGN-R1 survivent moins bien aux infections à pneumocoque (à la fois suite à des inoculations par voies intrapéritonéales et intranasales) et leurs macrophages sont moins aptes à lier et phagocyter les bactéries [97, 98]. Il est intéressant de remarquer que les macrophages alvéolaires n'expriment pas SIGN-R1, l'effet protecteur de SIGN-R1 n'a donc probablement pas lieu au niveau pulmonaire. Que ce soit en injection intrapéritonéale ou intranasale, les souris KO SIGN-R1 développent des infections systémiques caractérisées par un plus grand nombre de bactéries dans le sang que les souris sauvages. De plus on note un niveau réduit d'IgM anti-phosphocholine chez les souris KO SIGN-R1. En conclusion, ces données indiquent que SIGN-R1, au-delà de son implication directe dans la phagocytose, est probablement important pour la mise en place

d'une réponse systémique au pneumocoque, en lien avec l'établissement d'une réponse acquise efficace.

Les récepteurs dits scavenger SR-AI, SR-AII et MARCO sont également capables de reconnaître des structures de surface du pneumocoque, bien que leurs cibles ne soient pas actuellement connues [99, 100]. Les KO SR-AI/II ou MARCO chez les souris les rendent plus sensibles aux pneumonies à pneumocoques. On remarque également que les macrophages alvéolaires de souris KO MARCO présentent une réduction de leur capacité à lier et phagocyter les pneumocoques suggérant que MARCO est à la fois impliqué dans la liaison et l'internalisation des bactéries [99].

La paroi du pneumocoque est reconnue par différents TLR (Toll-like receptors) présents en surface des phagocytes, avec le concours du corécepteur CD14 et également de la LBP (LPS binding protein). Les TLR2 et 6 et la LBP reconnaissent le peptidoglycane [101, 102], les TLR1 et 2 et la LBP reconnaissent les acides lipotéichoïques [103, 104]. Le KO TLR2 chez les souris les rend plus sensibles à l'infection [105, 106], et la synthèse de TNF- α par les macrophages de souris, stimulés par des pneumocoques, est dépendante des TLR2 et 6 [107, 108]. La synthèse de TNF- α par des PBMC (peripheral blood mononuclear cells) est inhibée par des anticorps monoclonaux anti-TLR1, montrant que la reconnaissance du pneumocoque par le TLR1 induit également la synthèse du TNF- α [103]. Le rôle de la LBP paraît plus limité car elle permet seulement de faciliter la reconnaissance des ligands du TLR2 et des souris KO LBP ne présentent pas de réponse altérée aux pneumonies à pneumocoques [109].

Le TLR4 reconnaît la pneumolysine, une cytolysine produite par le pneumocoque [110]. Cette reconnaissance a un effet pro-inflammatoire [111] mais peut aussi induire l'apoptose des lymphocytes T [110]. Le KO TLR4 chez les souris augmente de manière modeste leur sensibilité aux infections respiratoires à pneumocoques, sans impact sur l'inflammation pulmonaire [112]. Aucun effet du KO TLR4 n'est observé en cas d'infection par injection intraveineuse [113]. La reconnaissance de la pneumolysine par le TLR4 semble donc avoir un effet protecteur très limité et restreint aux voies respiratoires.

Le TLR9, recruté dans les compartiments endocytiques, reconnaît les séquences CpG non méthylées bien plus abondantes dans l'ADN bactérien que chez les eucaryotes [114, 115]. Le KO TLR9 chez les souris augmente leur sensibilité aux pneumonies à pneumocoque de

manière encore plus drastique que le KO TLR2. De par sa localisation, le TLR9 pourrait servir à amplifier la réponse suivant la phagocytose.

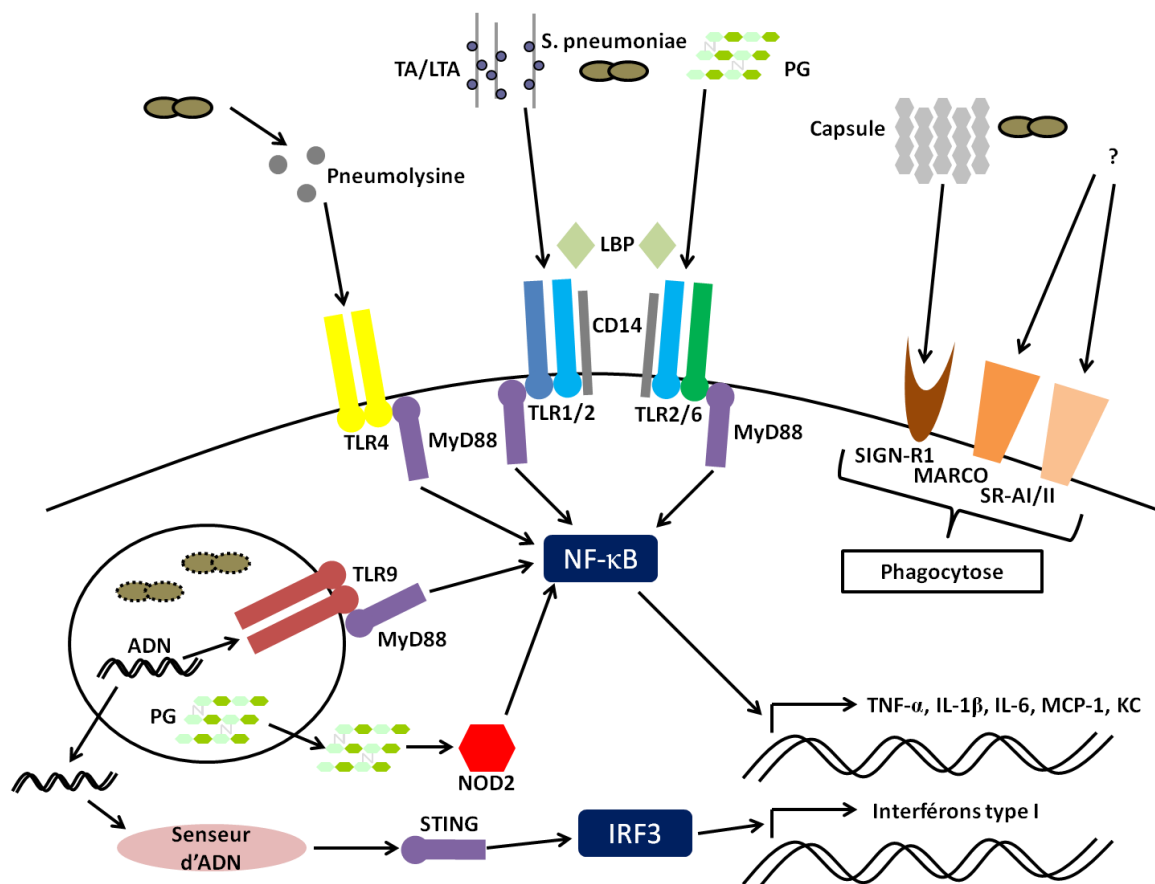


Figure I-7 : PRR cellulaires impliqués dans la reconnaissance du pneumocoque

TA : acides téichoïques, LTA : acides lipotéichoïques, PG : peptidoglycane

La famille des TLR est impliquée dans la réponse à une grande variété de micro-organismes pathogènes. Leur fonction principale est d'assurer la reconnaissance des pathogènes et d'initier une réponse inflammatoire conduisant à l'élimination du pathogène. Sur les 13 TLR mammifères connus, les TLR1, 2, 6 et 9 sont les principaux actuellement identifiés comme importants pour la réponse au pneumocoque. La signalisation en aval de la reconnaissance par les TLR est médiée par l'adaptateur MyD88. Les souris KO pour MyD88 sont particulièrement sensibles à différents types d'infections à pneumocoques, ce qui montre le rôle clé de cet adaptateur [116-118]. La signalisation par MyD88 aboutit à l'activation du facteur de transcription NF- κ B, contrôlant la synthèse d'un ensemble de cytokines inflammatoires dont TNF- α , IL-1 β , IL-6, KC, MCP-1. Ces cytokines sont impliquées dans l'apparition de la fièvre et la réaction de phase aiguë (TNF- α , IL-6), le recrutement et l'activation des neutrophiles (TNF- α , KC) et des macrophages (TNF- α , MCP-1), l'activation

des lymphocytes (IL-1 β , IL-6). Outre la réponse inflammatoire qui permet le recrutement de nombreux phagocytes au site d'infection, cette signalisation et l'environnement cytokinique qu'elle génère permet de polariser les CPA vers un profil adapté pour favoriser une réponse adaptative efficace.

Des protéines intracellulaires sont également capables de détecter des composants du pneumocoque. Ainsi, la protéine cytosolique Nod2 reconnaît le peptidoglycane du pneumocoque [119]. La reconnaissance par Nod2 participe à l'établissement de la réponse inflammatoire puisqu'elle conduit à l'activation du facteur de transcription NF- κ B qui lui-même induit la synthèse de MCP-1, TNF α et IL-6 [120, 121]. Au contraire la protéine Nod1 reconnaît le peptidoglycane des bactéries Gram-négatif et n'est donc pas en mesure de reconnaître le pneumocoque. Néanmoins, l'élimination de *S. pneumoniae* durant la co-colonisation avec *H. influenza* est liée à l'activation de Nod1 par le peptidoglycane de *H. influenza*. Ainsi des souris KO Nod1 montrent une réduction de la phagocytose du pneumocoque induite par la co-colonisation avec *H. influenza* [122].

Des senseurs d'ADN cytosoliques encore inconnus activent quant à eux, par le biais de la protéine STING et du facteur de transcription IRF3, la synthèse d'interférons de type I (IFN α/β) qui stimulent la production de RANTES (chimiokine permettant le recrutement de leucocytes) [123-125]. La réponse interféron de type I a longtemps été associée avec la défense antivirale mais son implication dans les infections bactériennes a été mise en évidence ces dernières années. Il est à noter que lors d'une co-infection avec le virus de la grippe, les hauts niveaux d'interférons de type I produits par la réponse antivirale diminuent l'expression des cytokines KC et MCP-1 qui sont requises pour l'élimination du pneumocoque, favorisant ainsi l'infection bactérienne [124, 126]. Le rôle des interférons de type I dans la réponse au pneumocoque reste ainsi pour l'instant peu clair, mais il est probable qu'une régulation fine de leur expression soit nécessaire pour assurer une réponse efficace.

On observe ainsi qu'un large panel de récepteurs présents en surface des phagocytes leur permet de reconnaître le pneumocoque. Cette reconnaissance peu spécifique ciblant des structures répétées présentes en surface de la bactérie (polysaccharides capsulaires, peptidoglycane...) par différentes protéines agit probablement comme un velcro moléculaire favorisant d'une part la liaison puis l'internalisation du pneumocoque afin d'assurer sa destruction, et d'autre part l'établissement de la réponse inflammatoire par la production de

diverses cytokines. Les récepteurs intracellulaires ont quant à eux probablement pour fonction d'amplifier la réponse cytokinique.

I-iv-1-d- Acteurs humoraux de la réponse innée au pneumocoque

Outre la réponse cellulaire, une réponse humorale innée est également essentielle pour assurer l'élimination du pneumocoque. Un ensemble de PRR solubles permettent de faciliter la reconnaissance du pneumocoque par les phagocytes (figure I-8). Ces protéines sont multimériques et le phénomène d'avidité entraîné par la reconnaissance multivalente est capitale pour la reconnaissance des pathogènes, les interactions monovalentes engagées étant souvent de faible affinité.

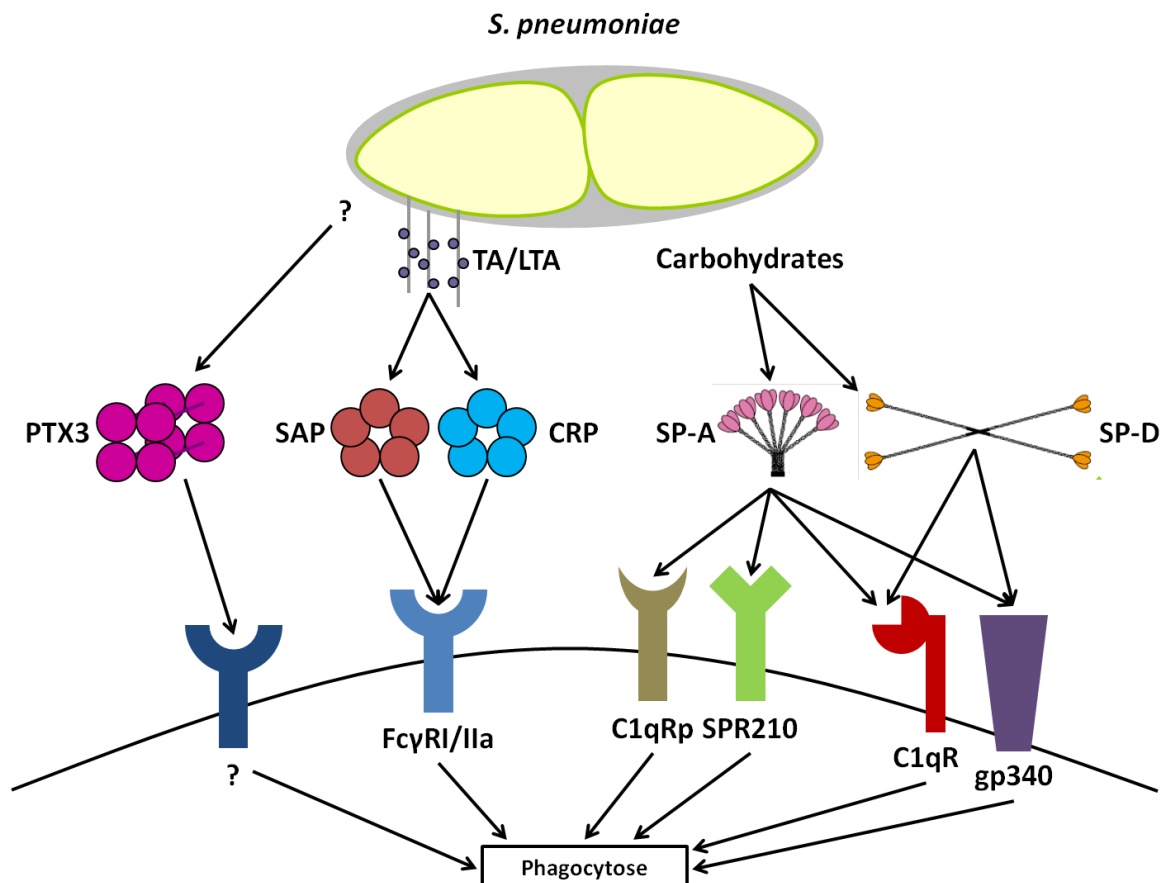


Figure I-8 : PRR solubles impliqués dans la reconnaissance du pneumocoque

TA : acides téichoïques, LTA : acides lipotéichoïques, PTX3 : pentraxine 3, SAP : composant amyloïde P sérique, CRP : protéine C réactive, SP-A : protéine du surfactant A, SP-D protéine du surfactant D

Il a ainsi été montré que plusieurs membres de la superfamille des pentraxines se lient au pneumocoque. Les pentraxines courtes sont des homopentamères produites par le foie et leur synthèse augmente durant la réaction de phase aiguë [127]. La protéine C réactive (CRP) et le

composant amyloïde P sérique (SAP) sont les 2 prototypes de la classe des pentraxines courtes, il a été montré qu'elles sont capables de reconnaître les résidus phosphocholine associés aux acides lipotéichoïques du pneumocoque, et ont un rôle important dans la réponse immune [128, 129]. Cette reconnaissance induit la phagocytose, la CRP et la SAP se liant aux récepteur d'immunoglobulines G FcγRI et FcγRIIa présents en surface des neutrophiles et des monocytes / macrophages [130, 131]. La pentraxine 3 (PTX3) est le prototype de la famille des pentraxines longues, formant majoritairement un homodécamère stabilisé par des ponts disulfures, et produite principalement par les neutrophiles, macrophages, cellules dendritiques et cellules endothéliales en réponse à des signaux inflammatoires [132, 133]. Il a été montré que la PTX3 se fixe au pneumocoque et améliore la phagocytose, bien qu'aucun ligand n'ait à ce jour été identifié à la surface du pneumocoque [134, 135].

Parmi les autres PRR solubles, les collectines reconnaissent également le pneumocoque. Les collectines sont des collagènes de défense dont les monomères sont constitués d'un court domaine N-terminal suivi d'un domaine collagène, lui-même lié à un domaine lectine type C (dit CRD, carbohydrate recognition domain) par une région charnière. La région charnière induit une trimérisation stabilisée par les domaines collagènes, rapprochant les CRD et permettant la reconnaissance des répétitions de ligands plutôt que des ligands isolés. Le domaine N-terminal permet une oligomérisation de plus haut ordre par la formation de ponts disulfures. Les protéines du surfactant A et D (SP-A et SP-D) sont 2 collectines reconnaissant les sucres en surface du pneumocoque et favorisant son élimination [136, 137]. Diverses protéines en surface des phagocytes ont été identifiées comme récepteurs pour la SP-A (C1qRp/CD93, SPR210) ou SP-A et SP-D (C1qR/calreticuline+CD91, gp340) [138-141]. Il a été montré que la SP-A favorise la phagocytose du pneumocoque par les macrophages et les souris KO SP-D sont plus sensible aux infections [136, 137].

1-iv-1-e- Le système du complément

Le système du complément est un composant capital de la réponse innée à de nombreux pathogènes dont *S. pneumoniae*. Dans le cadre de la réponse au pneumocoque, la voie classique du complément joue un rôle essentiel mais la voie des lectines et la voie alterne sont aussi impliquées [142, 143].

La voie classique du complément est initiée par la reconnaissance du pathogène par le complexe C1 (formé de C1q, un dimère de C1r et un dimère de C1s). Le changement de conformation induit par cette reconnaissance active les deux molécules de C1r qui, grâce à

leur activité serine protéase, clivent les deux C1s, elles même des serine protéases. Le complexe est alors en mesure de cliver C4, dont le fragment C4b se lie de manière covalente à des sucres et des protéines présents à la surface du pathogène, et C2 dont le fragment C2a forme avec C4b la C3-convertase. Cette C3-convertase permet de cliver la protéine C3 dont le fragment C3b s'associe, lui aussi de manière covalente, aux carbohydrates et protéines de surface du pathogène, conduisant à son opsonisation et permettant d'augmenter considérablement la phagocytose.

La voie des lectines diffère de la voie classique dans ses premières étapes, la reconnaissance étant assurée par des protéines liant des motifs saccharidiques répétés telles que la MBL (une collectine dodécamérique de structure similaire à SP-A) ou les ficolines (des collagènes de défense reposant sur un domaine fibrinogène pour la reconnaissance). Les protéases MASP associées sont responsables du clivage de C4 et C2. Concernant le pneumocoque il a été montré que la M-ficoline reconnaît les polysaccharides capsulaires de certains sérotypes de pneumocoques [144]. D'autre part, des travaux réalisés en collaboration avec Emilie Stermann du groupe IRPAS (IBS) dirigé par Nicole Thielens, ont montré que la L-ficoline reconnaît différents groupes saccharidiques des acides téichoïques ainsi que les molécules de phosphocholine. Cette reconnaissance du pneumocoque par la L-ficoline conduit à l'activation du complément (manuscrit en cours de rédaction).

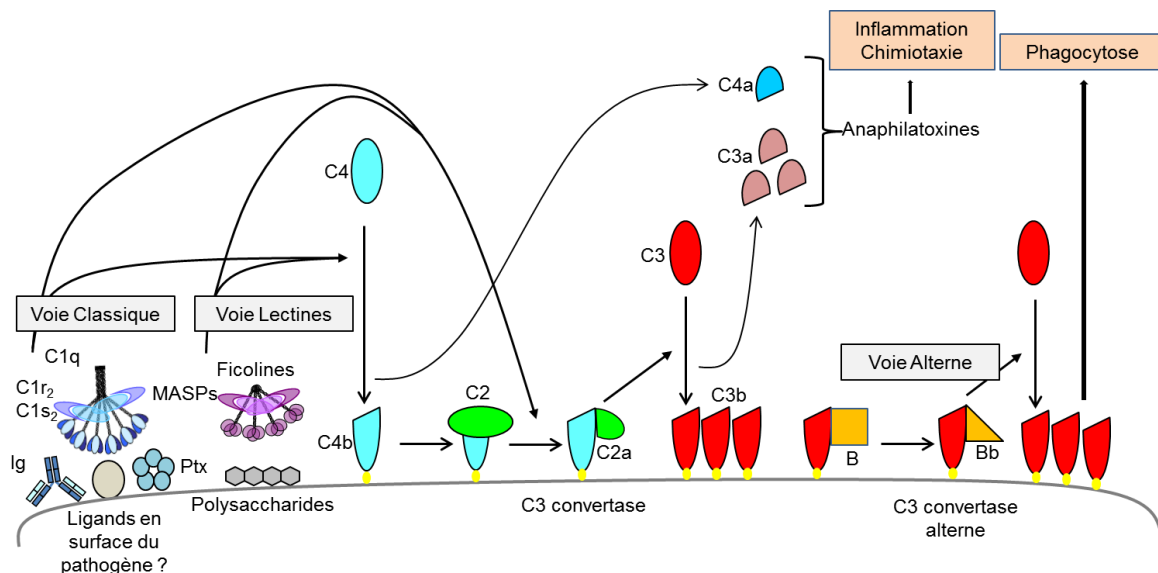


Figure I-9 : Activation de la cascade du complément

Ig : immunoglobulines, Ptx : pentraxines, B : facteur B

La voie alterne est quant à elle initiée par l'hydrolyse spontanée de C3 qui va permettre la liaison à C3b du facteur B. Le facteur D clive alors B en Ba et Bb, ce dernier reste associé à C3b, formant la C3-convertase alterne qui agit par la suite de manière identique à la C3-convertase classique. La voie alterne permet également l'amplification des voies classique et lectine [95, 145].

L'activation de l'une ou de plusieurs des trois voies du complément peut conduire à la lyse de la cellule ciblée. La concentration accrue de C3b à la surface du microorganisme favorise l'interaction avec la C3-convertase, formant alors la C5-convertase. Celle-ci clive le facteur C5 générant les molécules de C5a, une puissante chimiokine et anaphilatixine permettant d'induire une forte réponse inflammatoire et C5b qui est à la base de la formation du complexe d'attaque membranaire. C5b se lie en effet de manière covalente à la membrane et recrute la protéine C6. Le complexe C5b6 reste associé à C3b jusqu'au recrutement de C7 et C8 qui, après une transition structurale hydrophile / amphiphile, insèrent des domaines hydrophobes dans la bicouche phospholipidique. La formation du pore qualifié de complexe d'attaque membranaire (MAC pour membrane attack complex) est finalisée par le recrutement et l'oligomérisation de C9. Les coques Gram-positif, dont le pneumocoque, sont naturellement résistants à la lyse osmotique induite par les MAC. En effet, bien que les protéines du MAC puissent s'associer à la surface du pneumocoque elles ne semblent pas s'insérer dans la membrane. Il a été proposé que cette résistance serait due à l'épaisseur importante de la paroi chez les bactéries Gram-positif qui empêcherait l'accès des protéines du MAC à la membrane [146].

Compte-tenu de l'importance du système du complément dans la réponse immune, il est primordial qu'un mécanisme efficace de régulation existe. L'importance de cette régulation est mise en exergue par le grand nombre de régulateurs identifiés, qui opèrent à tous les niveaux de la cascade. Ces régulateurs sont soit des protéines solubles, soit des protéines membranaires qui empêchent l'activation du complément à la surface des cellules du soi. Parmi les régulateurs solubles, certains inhibent l'activation des voies classiques et lectines. On trouve en particulier C1INH (C1 inhibitor) qui inhibe les protéases (C1r, C1s et MASP) et C4BP (C4-binding protein) qui inhibe l'action de C4 en accélérant la dissociation de la C3-convertase mais favorise également la dégradation de C4b et C3b par le facteur I [147, 148]. La voie alterne est inhibée par le facteur H qui entraîne la dégradation de C3b par le facteur I et accélère la dissociation de la C3-convertase alterne [149]. La phase lytique est quant à elle inhibée par plusieurs protéines telles que CFHR1, la clusterine ou encore la vitronectine [150-151].

152]. Parmi les régulateurs membranaires, CD46 inhibe l'action de C3b et C4b en facilitant leur dégradation par le facteur I [153]. CD55 empêche l'assemblage des C3-convertases et accélère leur dissociation [154]. CD59 inhibe quant à lui la phase lytique, en empêchant l'oligomérisation de C9 [155].

I-iv-1-f- C1q, un collagène de défense avec de multiples capacités de liaison

A la base de la voie classique se trouve la reconnaissance de structures de surface du pathogène ou d'autres effecteurs solubles de l'immunité par le complexe C1, et plus particulièrement par C1q. C1q est une protéine multimérique, dont l'unité de base est un monomère composé de trois sous-unités différentes appelées chaînes A, B et C. Chaque chaîne est constituée d'une partie N-terminale de type collagène et d'une tête globulaire C-terminale. Les queues collagènes sont constituées d'un motif Gly-X-Y (X étant souvent une proline et Y étant souvent une proline, une hydroxyproline ou une hydroxylysine). Une charnière semi-flexible est obtenue dans la structure par une interruption du motif Gly-X-Y par un Gly-X. Les régions collagènes de chacune des trois chaînes s'associent pour former une triple hélice rassemblant les têtes globulaires, et l'assemblage est stabilisé par des ponts disulfures inter-chaînes à l'extrémité N-terminale. La molécule de C1q est un hexamère formé par l'assemblage de 6 des monomères en triple hélice, qui présente une structure caractéristique en forme de bouquet de tulipes (Figure I-10) [156, 157].

Du fait de cette structure particulière, qui produit des domaines de liaison (les têtes globulaires) composées de trois sous-unités différentes, contrairement aux autres collagènes de défense qui ne sont assemblés qu'à partir d'une seule sous-unité, C1q est capable de lier une grande variété de ligands, souvent polyioniques (fibrilles β -amyloïdes, prions, lipide A...) [158]. Notre collaborateur Philippe Frchet (IBS, groupe IRPAS) a par exemple montré que C1q est capable de reconnaître la phosphatidylsérine et l'ADN [159, 160]. Cette caractéristique suggère que C1q puisse fonctionner comme une molécule reconnaissant des motifs chargés. La structure cristalline des régions globulaires de C1q montre que bien qu'il y ait une apparente symétrie entre les trois modules C-terminaux formant la tête globulaire, d'importantes différences dans la répartition des résidus chargés et hydrophobes entre les différents modules peuvent être mises en évidence (Figure I-11 a) [161]. Ainsi la pseudo-triple symétrie observée au niveau de la structure tertiaire des têtes globulaires disparaît lorsque l'on considère la distribution des charges en surface. Il devient ainsi envisageable que chacune des 3 sous-unités puisse potentiellement établir des interactions individuellement,

mais la structure compacte des têtes globulaires permet également la reconnaissance de ligands impliquant des résidus de plusieurs sous unités [162].

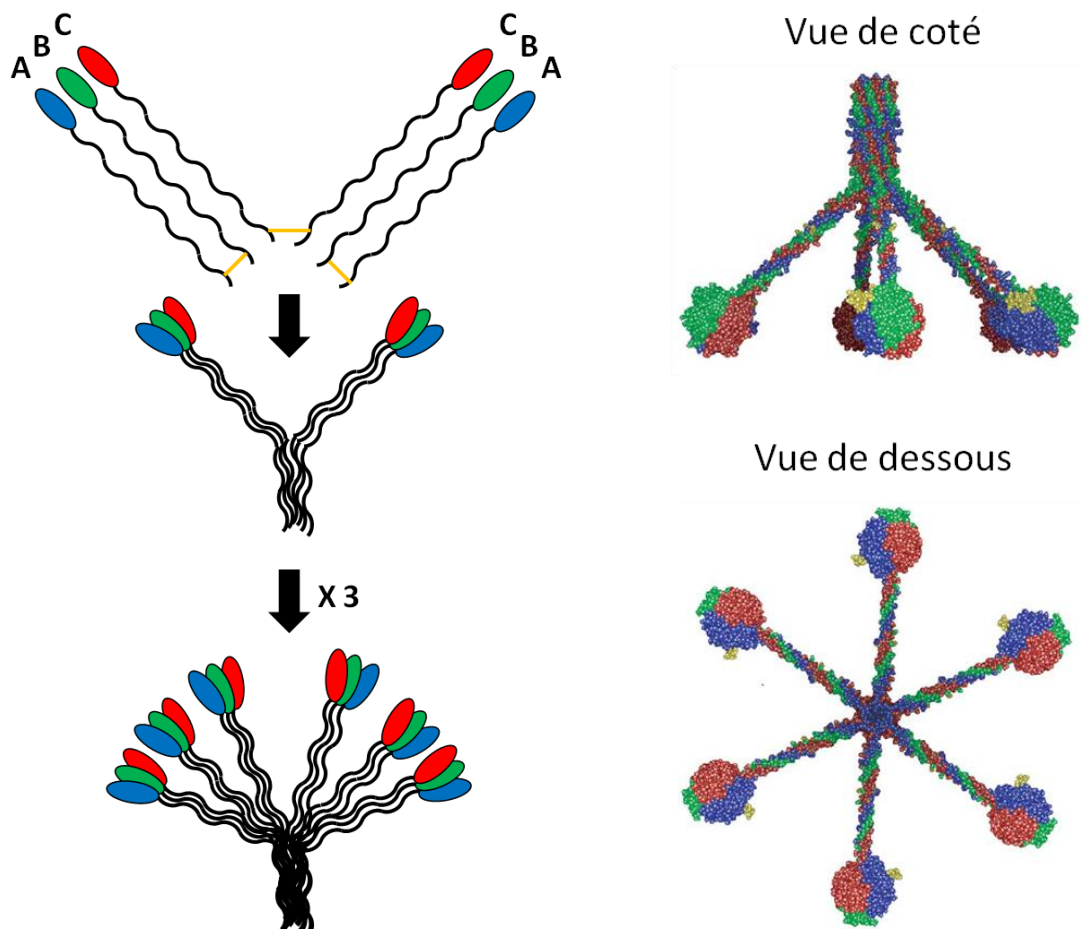


Figure I-10 : Assemblage et structure de C1q

Mécanisme d'assemblage proposé des 18 polypeptides composant C1q (gauche), les chaînes A et B dimérisent grâce à un pont disulfure à l'extrémité N-terminale et deux chaînes C forment un homodimère par un pont disulfure similaire. Deux dimères A-B s'associe aux chaînes C pour former deux structures en triple hélice liées par le pont disulfure entre les chaînes C. Trois structures de ce type forment C1q en associant leurs extrémités N-terminales. Modèle de la structure tridimensionnelle de C1q (droite) dérivé de la structure cristallographique des têtes globulaires [162], les chaînes A sont représentées en **bleu**, les chaînes B en **vert** et les chaînes C en **rouge**.

Les têtes globulaires de C1q sont capables de reconnaître différentes molécules de l'immunité innée telles que les pentraxines CRP, SAP et PTX3 [163-165], et de l'immunité acquise telles que les IgG et IgM [166, 167]. Ces interactions avec d'autres protéines de l'immunité permettent à C1q de reconnaître ses cellules cibles de manière indirecte. Les mécanismes de reconnaissance de certains de ces ligands par les têtes globulaires de C1q ont été étudiés de manière détaillée, et permettent d'illustrer la variabilité des modes de liaison de ces domaines de reconnaissance. Ainsi un modèle d'interaction des têtes globulaires avec la

protéine C-réactive a été proposé à partir de données structurales et d'expériences de mutagenèse [168, 169]. Dans ce modèle l'extrémité de la région globulaire de C1q, où prédominent des résidus basiques, s'insère dans le pore central chargé négativement de la CRP, ce qui représente une interaction impliquant les trois sous-unités de C1q (Figure I-11 b). Un autre modèle d'interaction concerne la reconnaissance des IgG de classe 1 humaines [170-174]. Ce modèle propose une fixation de la région équatoriale de la sous-unité B du domaine globulaire de C1q au niveau de l'interface Fab-Fc de l'anticorps [161]. Dans ce cas, la reconnaissance des immunoglobulines n'est médiée que par une seule des sous unités de C1q (Figure I-11 c).

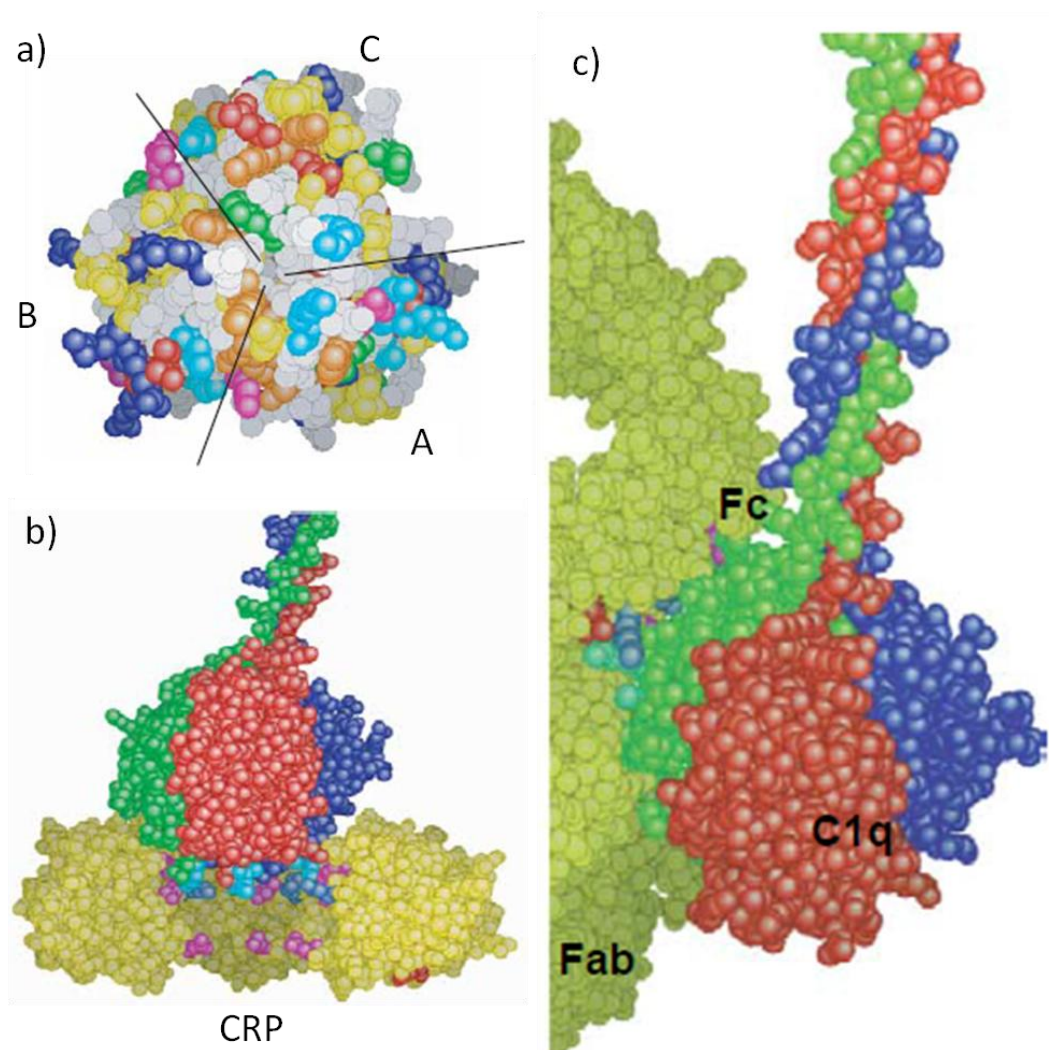


Figure I-11 : Diversité de reconnaissance par les têtes globulaires de C1q [162]

a) Vue de face d'une région globulaire de C1q, les résidus basiques sont représentés en bleu, les résidus acides en rouge et les résidus hydrophobe en jaune. A, B et C indiquent les trois sous-unités différentes formant la tête globulaire. b) Modèle de l'interaction C1qGR-CRP, pour plus de clarté seuls trois des cinq monomères de la CRP sont représentés. c) Modèle de l'interaction entre C1qGR et une IgG1. B et c) les sous unités de C1q sont représentées en **bleu** pour la chaîne A, **vert** pour la chaîne B et **rouge** pour la chaîne C.

Bien que la plupart des ligands de C1q soient reconnus par les têtes globulaires, les parties collagènes établissent également des interactions avec d'autres protéines essentielles pour la fonction de C1q. Le site de fixation des protéases C1r et C1s, qui s'associent à C1q pour former le complexe C1 [175], est en effet situé au niveau des régions collagènes de C1q [176]. À partir des données structurales acquises sur C1q, C1r et C1s, ainsi que des informations obtenues par des approches génétiques et biochimiques sur l'activation de C1r₂-C1s₂, un modèle de l'activation du complexe C1 a été proposé par Nicole Thielens et Christine Gaboriaud (IBS, groupe IRPAS) (Figure I-12) [162]. La structure en forme de « 8 » du proenzyme C1s-C1r-C1r-C1s non-activé est incompatible avec le phénomène d'auto-activation de C1r qui déclenche la cascade du complément [177]. Cette auto-activation requiert un contact entre les domaines SP (pour Serine Protease) des deux monomères de C1r, qui sont éloignés dans cette forme au repos (Figure I-12 a) [178]. Le modèle proposé par nos collaboratrices du groupe IRPAS est que le signal déclenchant l'activation de C1r est un stress mécanique transmis à travers l'interface C1q-C1r-C1s, depuis la tige collagène de C1q vers la région catalytique de C1r, lorsque les têtes globulaires se lient à une cible. Il est concevable qu'une interaction multivalente de C1q avec un ensemble de sites de liaison distants modifie l'orientation des parties C-terminales des régions collagènes, qui sont mobiles grâce à la présence de la charnière, en les faisant s'écarter de l'axe représenté par leurs extrémités N-terminales [179]. Cet écartement des parties collagènes entraînerait l'ouverture du proenzyme C1s-C1r-C1r-C1s, rendant possible l'interaction entre les domaines SP des deux monomères de C1r et permettant ainsi l'activation de C1r (Figure I-12 b). L'activation subséquente de C1s requiert une interaction entre son domaine SP et celui d'un monomère de C1r [180], probablement celui du dimère C1r-C1s opposé. Dans le modèle proposé ce contact peut être obtenu par un mouvement du domaine SP de C1s vers l'intérieur ou un mouvement du domaine SP de C1r vers l'extérieur, voir les deux en même temps (Figure I-12 c). Ce modèle permet donc d'envisager l'activation du complexe C1 comme un processus mécanique reposant sur le déplacement des tiges collagènes de C1q suite à la reconnaissance de plusieurs ligands par les têtes globulaires.

Dans la structure proposée pour C1q l'orientation des têtes globulaires présente systématiquement la chaîne B vers l'extérieur. Il serait par contre envisageable que suivant la zone d'interaction mise en jeu entre les ligands et les têtes globulaires une distorsion plus ou moins forte de C1q soit obtenue, altérant l'ouverture du proenzyme C1s-C1r-C1r-C1s et diminuant l'activation du complexe C1.

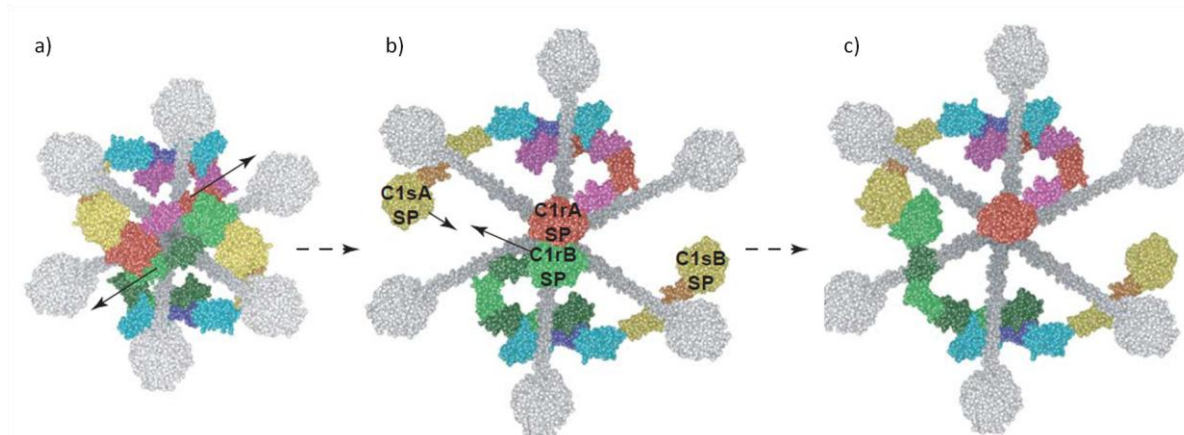


Figure I-12 : Modèle d'activation du complexe C1 [162]

a) Le proenzyme C1s-C1r-C1r-Cs est sous sa forme au repos (forme en « 8 »), associé à C1q qui est représenté en conformation « fermé ». Les flèches représentent le mouvement d'écartement nécessaire à l'ouverture du proenzyme. b) L'écartement des tiges collagènes de C1q (représenté en conformation « ouvert ») modifie la conformation du proenzyme, qui prend une forme en « S », les domaines SP des C1r se retrouvent en contact et s'activent mutuellement. c) Conformation transitoire représentant l'activation de C1s.

l-iv-1-g- Importance du complément dans l'immunité au pneumocoque

La reconnaissance du pneumocoque par C1q est un élément clé de la réponse immunitaire innée face à ce pathogène, le KO de C1q rendant les souris beaucoup plus sensibles aux infections [142]. Bien que des récepteurs à C1q soient présents sur les phagocytes (C1qR/calreticuline+CD91, C1qRp/CD93 et CR1/CD35) et qu'ils puissent favoriser la phagocytose [138, 181, 182], C1q n'est en lui-même pas une opsonine très efficace. L'activation du complément est en effet capitale pour l'élimination du pneumocoque, l'opsonisation par C4b et surtout par C3b permettant une amélioration très importante de la phagocytose [183]. Ainsi des souris KO C4 ou C3 s'avèrent extrêmement sensibles au pneumocoque [142]. Un ensemble de récepteurs en surface des phagocytes reconnaissent C3b et ses dérivés : CR1/CD35, CR2/CD21, CR3/CD11b+CD18, CR4/CD11c+CD18 et CR1g et favorisent la phagocytose des cellules opsonisées [184-188]. C3 étant la protéine du complément la plus abondante avec une concentration sérique de 1-1,5 mg/mL (par comparaison la concentration de C1q est d'environ 0,1 mg/mL), C3b est déposé en grande quantité quand le complément est activé. La densité importante de C3b en surface des cellules cibles facilite d'autant plus la phagocytose.

Outre l'opsonisation du pathogène, l'activation du complément a également d'autres effets grâce aux fragments solubles relargués lors de l'activation protéolytique de certaines protéines. C4a et C3a sont en effet des anaphylatoxines, C3a étant notablement plus efficace

que C4a. Les anaphylatoxines ont une large variété d'actions, elles causent la dégranulation des basophiles et des mastocytes, provoquent la contraction des muscles lisses. Dans le cadre de la réponse au pneumocoque, l'augmentation de la perméabilité vasculaire par les anaphylatoxines favorise le recrutement des monocytes et des neutrophiles au site d'infection [189, 190]. Les anaphylatoxines ont également un effet chimiotaxique, la liaison de C3a à son récepteur C3aR sur les leucocytes conduit à leur migration vers le site d'infection, où est produit un gradient de C3a [191, 192]. Cette activité permet là encore de recruter des phagocytes afin d'éliminer le pneumocoque. Enfin, les anaphylatoxines sont également impliqués dans la modulation de l'immunité adaptative en contribuant à déterminer le profil d'activation des cellules dendritiques, les principales CPA. Ainsi en l'absence de signalisation par le récepteur C3aR sur les cellules dendritiques, celles-ci activent des lymphocytes Treg [193], qui ne sont pas produits en réponse à une infection à pneumocoques dont la résolution est plutôt dépendante de lymphocytes Th17 [194]. Ceci tend à prouver l'implication de C3a dans l'établissement de la réponse adaptative au pneumocoque.

Il est à noter que le fragment C5a est la plus puissante des anaphylatoxines produites par le complément, son effet chimiotactique est plus important que pour C3a et elle permet également l'activation des phagocytes, stimulant leur burst oxydatif et leur production de cytokines. L'importance de C5a dans la réponse au pneumocoque est cependant discutable. Ainsi, bien que le recrutement de neutrophiles au site d'infection par des souris KO C5 soit réduit, une activité chimiotactique est toujours détectable et un recrutement significatif de neutrophiles est observé [195]. Des expériences menées à l'aide de souris déficientes en C5 ont également montré que C5 joue un rôle bien moins important que C3 dans la défense contre le pneumocoque [183]. Enfin, il a été montré que la signalisation par les récepteurs C3aR et C5aR sur les cellules dendritiques conduit à l'activation de lymphocytes Th1. En revanche en l'absence de signalisation par C5aR les cellules dendritiques activent des lymphocytes Th17 [196], une réponse plus en accord avec celle mise en place face au pneumocoque. Ces résultats semblent donc indiquer que si il y a production de C5a lors de l'activation du complément en réponse à une infection par le pneumocoque, le taux de C3a doit cependant être bien supérieur, orientant les cellules dendritiques vers une réponse de type Th17.

En conclusion, il apparait donc que dans le cadre de la réponse à une infection au pneumocoque l'activation des premières étapes de la cascade du complément est essentielle. C'est en premier lieu la voie classique qui est mise à contribution mais la voie des lectines

joue également un rôle. Nos collaboratrices Nicole Thielens et Emilie Stermann (IBS, groupe IRPAS) ont en effet montré que la L-ficoline reconnaît différents groupes saccharidiques des acides téichoïques ainsi que les molécules de phosphocholine, et que cette reconnaissance du pneumocoque par la L-ficoline conduit à l'activation du complément. Des souris KO pour le facteur B étant, au même titre que des souris KO C1q, beaucoup plus sensibles aux infections à pneumocoque [142], l'amplification par la voie alterne apparaît également importante. L'activation de C3 est un élément central dans l'activité du complément face au pneumocoque puisqu'il a à la fois des effets sur la réponse innée (opsonisation par C3b, chimiotactisme par C3a) et sur l'orientation de la réponse adaptative (activation des DC par C3a). Le complément apparaît donc, à l'instar de la signalisation par les TLR, comme un élément charnière entre les réponses innée et adaptatives.

I-iv-2- Réponse immunitaire adaptative au pneumocoque

Bien que dans un premier temps le système immunitaire inné permette de limiter la prolifération du pneumocoque, la résolution d'une infection à pneumocoque requiert une réponse adaptative efficace. Le développement de cette réponse repose avant tout sur l'action des cellules présentatrices d'antigène. Les CPA recrutées au site d'infection, au premier rang desquelles les cellules dendritiques, sont activées par un ensemble de signaux : signalisation par leurs récepteurs de surface reconnaissant le pathogène, environnement cytokinique et effet des anaphylatoxines ; cette activation se conjugue à la phagocytose des bactéries. Les CPA activées vont par la suite migrer vers les organes lymphoïdes secondaires, où elles peuvent activer différentes cellules de l'immunité en exposant à leur surface des éléments immunogéniques issus des bactéries digérées.

Dans le cadre d'une réponse efficace face au pneumocoque deux types cellulaires différents sont activés par les CPA (Figure I-13). Il a ainsi été montré dans des modèles d'infection chez la souris que la résolution de l'infection et la protection des souris était dépendante de l'activation de lymphocytes T CD4⁺ [89, 111]. Plus spécifiquement, l'activation de lymphocytes Th17 semble être déterminante pour l'élimination du pneumocoque chez la souris [194], une observation renforcée par le fait que des patients présentant une mutation dans le gène STAT3 (incapables de produire des lymphocytes Th17) sont beaucoup plus sensibles aux infections à pneumocoques. L'activation des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires résulte de la rencontre entre des lymphocytes T naïfs et les CPA activées. Les CPA présentent à leur surface des molécules du complexe majeur

d'histocompatibilité de classe II chargés de peptides provenant de la dégradation des protéines du pneumocoque. Une synapse immunologique va être formée par l'interaction entre ce complexe CMH-peptide et les TCR (T cell receptor) de lymphocytes spécifiques pour des peptides du pneumocoque. Le corécepteur CD4 reconnaît quant à lui le CMH-II, et les interactions d'un ensemble d'autres récepteurs en surface de la CPA (ex : B7, LFA-3, ICAM-1) et du lymphocyte (ex : CD28, CD2, LFA-1) complètent la synapse immunologique. Ce sont ces interactions, ainsi que les cytokines produites par la CPA, qui vont activer le lymphocyte T CD4⁺ selon un profil particulier (Th1, Th2, Th17, Treg...). Les lymphocytes Th17 activés en réponse à l'infection par le pneumocoque vont, comme tous les lymphocytes T helpers, participer à l'activation et à la maturation des lymphocytes B. Les lymphocytes Th17 sont également caractérisés pour leur production prédominante d'interleukine 17A [197]. L'IL-17A est une puissante cytokine inflammatoire qui induit la production de nombreuses autres cytokines et chimiokines (IL-6, G-CSF, GM-CSF, IL-1 β , TGF- β , TNF- α , IL-8, MCP-1) par une large variété de cellules présentant l'un des récepteurs IL-17R (fibroblastes, cellules endothéliales, cellules épithéliales, keratinocytes, et macrophages) [198]. La migration des lymphocytes Th17 au site d'infection et leur production d'IL-17A conduit à un recrutement encore plus massif de monocytes et surtout de neutrophiles et à leur activation, qui aident à résoudre l'infection.

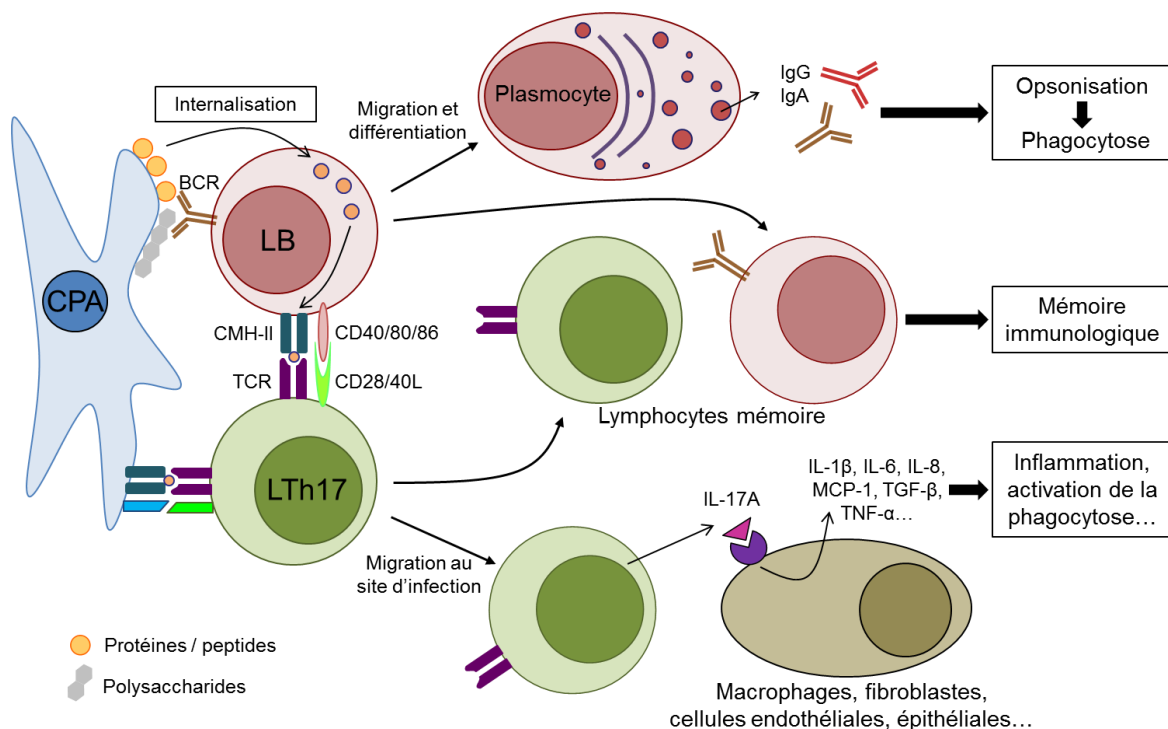


Figure I-13 : Immunité acquise au pneumocoque

CPA : cellule présentatrice d'antigène, LB : lymphocyte B, LTh : Lymphocyte T helper

Un autre type cellulaire est activé par les CPA durant l'établissement de la réponse adaptative au pneumocoque, les lymphocytes B. Les lymphocytes B présentent à leur surface un BCR (B cell receptor) qui est formé d'une immunoglobuline membranaire (IgM pour les lymphocytes B naïfs) et de CD79 qui assure la transduction du signal. Au contraire des TCR qui reconnaissent des peptides, les BCR reconnaissent généralement des structures natives. Par conséquent, les CPA présentent à leur surface des fragments de capsule ou des protéines du pneumocoque non dégradés (voire des bactéries entières n'ayant pas été internalisées). L'activation des lymphocytes par le BCR seul est cependant relativement faible, les plasmocytes dérivant de ces lymphocytes B ne subissent pas de commutation isotypique ni de maturation d'affinité et produisent donc des IgM d'affinité limitée pour leurs ligands. Les lymphocytes B sont néanmoins capables d'internaliser des peptides ou protéines provenant du pathogène transportés par les CPA, et de présenter par leur CMH-II des peptides qui peuvent alors être reconnus par les lymphocytes T. La reconnaissance par les lymphocytes Th17 activés de complexes CMH-peptides en surface des lymphocytes B leur permet, par le biais d'autres protéines de surface (ex : CD28, CD40L) se liant à des récepteurs des lymphocytes B (ex : CD80/86, CD40), d'activer la commutation de classe et la maturation d'affinité. Ces étapes supplémentaires dans l'activation des lymphocytes B permettent la production par les plasmocytes d'IgG ou d'IgA de forte affinité [199].

Les anticorps produits en réponse à une infection par le pneumocoque sont spécifiques pour certains de la capsule et pour d'autres de protéines de surface. Ils permettent l'opsonisation de la bactérie, directement en se fixant aux récepteurs au fragment Fc (FcR) des phagocytes, ou indirectement par l'activation du complément du fait de leur reconnaissance par C1q. C'est cette réponse anticorps qui est développée dans le cadre de la vaccination contre *S. pneumoniae*, ce qui montre l'importance de ces anticorps dans l'élimination du pneumocoque [200, 201]. La mise en place de la réponse adaptative permet aussi le développement d'une mémoire immunologique, sous la forme de lymphocytes B et T mémoires, qui permet par la suite une réponse plus efficace et rapide si le pathogène est à nouveau rencontré. Le principal déterminant immunogénique du pneumocoque étant la capsule, une protection complète par la mémoire immunologique n'est cependant possible qu'à l'encontre du sérotype capsulaire rencontré (sauf en cas de réaction croisée entre sérotypes).

Il est important de noter ici que, contrairement à la réponse immunitaire innée qui repose sur la reconnaissance du pathogène par le biais d'interactions généralement peu spécifiques,

la réponse adaptative met en jeu des interactions très spécifiques. Les lymphocytes B et T activés sont ainsi recrutés puis amplifiés à partir d'un vaste réservoir de cellules naïves, dont les BCR ou TCR qui présentent une extrême diversité constituent ce qui est communément appelé le répertoire immunologique. Les estimations de la taille de ce répertoire varient de 10^7 à 10^{10} récepteurs différents [199].

En conclusion, il apparaît que la réponse immunitaire face au pneumocoque est un mécanisme complexe qui nécessite l'intervention de nombreux acteurs à la fois cellulaires et humoraux. L'immunité innée joue un rôle capital en limitant la prolifération de la bactérie et en assurant le développement de la réponse adaptative. Les phagocytes et le système du complément sont les deux éléments essentiels de cette réponse innée, qui permettent grâce à l'opsonisation et à la phagocytose du pathogène d'assurer sa destruction mais aussi de diriger le développement de l'immunité acquise, via notamment les cellules présentatrices d'antigènes qui agissent en véritable chefs d'orchestres de l'immunité acquise. Le développement d'une réponse adaptative appropriée permet la résolution de l'infection grâce à une opsonisation accrue, à un recrutement et une activation augmentés des phagocytes. La coordination entre les éléments de l'immunité innée et acquise apparaît donc comme essentielle pour une réponse efficace au pneumocoque.

I-v- Complément et apoptose

Comme décrit précédemment, C1q est une protéine de l'immunité innée reconnaissant divers pathogènes, qui participe à la mise en place d'une réponse inflammatoire et à l'opsonisation du pathogène en vue de son élimination. Alors qu'une déficience en C1q rend les hôtes plus sensibles aux infections, on remarque de façon surprenante une association entre déficience en C1q et maladies auto-immunes [202, 203]. Ce lien, qui est corrélé avec une inflammation excessive, suggère un rôle immunosuppresseur ou tolérogène de C1q. Il a été montré qu'un défaut d'élimination des cellules apoptotiques est à l'origine de diverses maladies auto-immunes [204], et que des souris déficientes en C1q présentent une quantité accrue de corps apoptotiques dans leurs tissus [203]. Dans cette optique, un rôle du système du complément dans l'élimination des cellules apoptotiques paraît pertinent.

I-v-1- Apoptose : Rôles et mécanismes

I-v-1-a- Rôles physiologiques et pathologiques

Observée pour la première fois par Walther Flemming en 1885 en Allemagne, l'apoptose est décrite en 1972 par Kerr, Wyllie et Currie lors de l'étude de tissus par microscopie électronique comme un phénomène de mort cellulaire programmée [205]. Physiologiquement, l'apoptose est impliquée dans un grand nombre de processus, lors notamment du développement chez l'homme : morphogénèse (creusement des espaces interdigitaux, disparition de l'appendice caudal...) [206], développement neurologique (remodelage cérébral puis sélection des liaisons synaptiques utiles) [207], développement du système immunitaire (élimination des lymphocytes autoréactifs) [208]. L'apoptose contribue à l'homéostasie cellulaire, il existe en effet un équilibre étroit entre l'apoptose et la fabrication de nouvelles cellules ce qui permet d'éviter la prolifération cellulaire [209]. Elle permet également l'élimination des cellules dont l'ADN a subi des dommages irréparables [210].

Diverses maladies sont liées à des dérèglements des mécanismes qui contrôlent l'apoptose. Le déclenchement anormal ou excessif de l'apoptose joue un rôle dans le développement de différentes pathologies neurodégénératives, telles que l'amyotrophie spinale, la sclérose latérale amyotrophique, la chorée de Huntington, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson [211]. D'autre part, le blocage anormal de l'apoptose conduit au développement de cancers. En effet, les cellules cancéreuses sont des cellules dans lesquelles ce mécanisme ne fonctionne plus, elles survivent et se multiplient en dépit d'anomalies génétiques survenues au

cours de la vie de la cellule, qui auraient dû conduire à leur apoptose. Le développement de métastases est également dépendant de l'inhibition de l'apoptose, permettant à des cellules cancéreuses de migrer et de se multiplier à travers l'organisme [211, 212].

1-v-1-b- Caractéristiques et mécanismes

L'apoptose se manifeste sur des cellules isolées, caractérisées par un certain nombre de modifications morphologiques et biochimiques. Parmi les critères morphologiques, on observe une diminution du volume cellulaire, une relocalisation des organites cytoplasmiques, une condensation de la chromatine puis la fragmentation du noyau et du cytoplasme. La cellule forme des structures qualifiées de « bulles » en surface avant de se scinder en corps apoptotiques délimités par une membrane intacte contenant des organites, des fragments nucléaires et un cytoplasme condensé. La conservation de l'intégrité membranaire permet d'éviter la libération du contenu cellulaire qui provoquerait une réponse inflammatoire comme dans le cas de la nécrose. Parmi les critères biochimiques, on observe une chute du potentiel mitochondrial transmembranaire, une externalisation des résidus phosphatidylsérine (PS) de la membrane plasmique, une activation de la famille de protéases à cystéine ou caspases et une fragmentation de l'ADN en fragments de haut poids moléculaires ou en oligonucléosomes. Ces modifications morphologiques et biochimiques permettent, par l'exposition de marqueurs de surface comme la PS, la reconnaissance et la phagocytose des corps apoptotiques par les macrophages environnants dans lesquels ils subissent une dégradation rapide [213].

Il existe plusieurs voies de signalisation aboutissant à la mort cellulaire par apoptose. La première, appelée voie intrinsèque, met en jeu la mitochondrie qui occupe une place centrale dans les mécanismes de l'apoptose, et est gouvernée par des protéines appartenant à la superfamille de Bcl-2. Une autre voie est initiée à la surface de la cellule par des récepteurs membranaires de la superfamille des récepteurs au TNF, c'est la voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort. Ces deux voies de signalisation aboutissent toutes deux à l'activation des caspases, famille de protéases ayant un rôle clé dans l'apoptose, responsables des phénomènes morphologiques et biochimiques observés [212]. En plus de ces deux voies historiquement décrites, d'autres voies de signalisation ont été découvertes plus récemment : la voie indépendante des caspases met en jeu une protéine mitochondriale appelée AIF (Apoptosis Inducing Factor) [214], et le réticulum endoplasmique apparaît comme un compartiment cellulaire capable de déclencher de l'apoptose [215].

1-v-2- Implication du complément dans la phagocytose des cellules apoptotiques

La régulation du nombre de cellules par apoptose joue un important rôle dans l'homéostasie tissulaire et un défaut dans l'élimination des cellules apoptotiques conduit à leur accumulation, responsable de l'apparition de maladies auto-immunes. Le lien quasi systématique entre maladies auto-immunes, en particulier le lupus érythémateux disséminé, et déficience en C1q a conduit à mettre en évidence un rôle central de C1q dans l'élimination des cellules apoptotiques. Il a ainsi été montré que C1q, via ses têtes globulaires, se fixe aux cellules apoptotiques uniquement au niveau de « bulles » de surface [181, 216, 217]. Il apparaît que C1q favorise l'élimination des cellules apoptotiques par deux mécanismes différents. En premier lieu, C1q se fixe aux cellules apoptotiques et est reconnu par le récepteur C1qR/calreticuline+CD91 des phagocytes [181]. Les ligands de C1q en surface des cellules apoptotiques sont encore mal connus, mais il a été montré par l'équipe de Philippe Frchet à l'IBS que C1q reconnaît la PS [159]. L'interaction de C1q avec C1qR/calreticuline+CD91 permet d'induire directement la phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages et cellules dendritiques [181]. L'autre mode d'élimination des cellules apoptotiques par C1q implique l'activation du complément [216, 218, 219]. Il a en effet été montré que la reconnaissance par C1q des cellules apoptotiques pouvait activer la voie classique du complément, permettant le dépôt de C4 et C3, cette opsonisation conduisant à l'élimination des cellules apoptotiques par des cellules phagocytaires [220]. Les IgM interviennent dans l'élimination par phagocytose de cellules en apoptose tardive dans le péritoine. La liaison de C1q aux IgM activerait le complément, permettant l'opsonisation par C3 et donc la phagocytose des cellules en apoptose tardive [221, 222]. Cependant, comparée à la phagocytose médiée directement par C1q, l'opsonisation des cellules apoptotiques par C3 conduit probablement à une élimination plus efficace [223].

Il convient de souligner ici qu'il est capital que la phagocytose des cellules apoptotiques ait lieu dans un contexte anti-inflammatoire afin de maintenir la tolérance du système immunitaire. Une réponse inflammatoire serait à l'origine du développement d'une auto-immunité. Dans cette optique, l'activation du complément semble à priori contre-productive. Il faut néanmoins remarquer que l'activation du complément lors de la reconnaissance des cellules apoptotiques par C1q conduit à leur opsonisation par iC3b [224], un produit de dégradation de C3b protéolytiquement inactif qui est toujours reconnu par les récepteurs phagocytiques mais ne peut fixer le facteur B. Ce défaut de fixation du facteur B signifie que

iC3b ne peut activer la voie alterne. Il a effectivement été montré que la voie alterne du complément n'est pas impliquée dans l'opsonisation des cellules apoptotiques, la conversion de C3b en iC3b étant probablement trop rapide pour permettre son activation [219]. La conversion rapide de C3b en iC3b peut être due au recrutement à la surface de la cellule apoptotique de facteur I (par CD46 par exemple). De plus, la phagocytose de cellules apoptotiques opsonisées par iC3b oriente les macrophages vers une réponse anti-inflammatoire [225].

Il faut également remarquer que lors de la reconnaissance des cellules apoptotiques, C1q n'active pas forcément le complément. Le modèle pour l'activation des protéases associées à C1q veut que lors de la reconnaissance multivalente de C1q, des changements d'orientation des queues collagènes soient responsables de l'activation des protéases. Il est ainsi envisageable que, en fonction des ligands reconnus et de la manière dont ils sont reconnus, C1q active ou n'active pas le complément. Il est donc possible que des ligands de C1q en surface des cellules apoptotiques, signaux caractéristiques de cellules du soi ne nécessitant pas la mise en place d'une réponse inflammatoire, soient reconnus comme tels par C1q afin de ne pas déclencher une réponse inflammatoire inappropriée. Ces hypothèses doivent néanmoins être confirmées expérimentalement.

En conclusion, il apparaît que C1q, au-delà de ses fonctions dans la reconnaissance, l'opsonisation et l'élimination de pathogènes qui participent à un processus inflammatoire et au développement d'une réaction immunitaire, est également capable de reconnaître des cellules du soi altéré et de participer à la mise en place d'une réponse anti-inflammatoire et tolérogène.

I-vi- Surface du pneumocoque

Comme détaillé précédemment, la reconnaissance du pneumocoque par le système immunitaire dépend d'interactions établies entre des protéines de l'hôte, solubles ou en surface des cellules immunitaires, et des éléments présents en surface de la bactérie. Parallèlement, les mécanismes de virulence du pneumocoque reposent également sur des composants de la surface bactérienne. L'étude des structures présentes en surface du pneumocoque est donc essentielle pour la compréhension de ses interactions avec l'hôte.

I-vi-1- Structure générale de la surface

En 1884, Christian Gram montre, grâce à une technique de coloration qui porte son nom, que les bactéries se divisent en deux grands groupes: les bactéries dites Gram-positif qui gardent le colorant car imperméables au décolorant et apparaissent de couleur violette, et les bactéries dites Gram-négatif qui sont perméables au décolorant et donnent une coloration rose. Ce n'est que grâce au développement de la microscopie électronique dans les années 50 et la description des morphologies bactériennes que les différences observées lors des colorations Gram se trouvent expliquées (Figure I-14). Toutes les bactéries présentent en premier lieu une structure commune qui sépare le cytoplasme du milieu extérieur: la membrane plasmique, constitué d'une bicouche phospholipidique (35%) et de protéines (65%). La membrane plasmique des bactéries se distingue de celle des cellules eucaryotes par l'absence de stérols, qui lui confère une fluidité plus importante. Les bactéries Gram-positif, dont *S. pneumoniae* fait partie, possèdent une paroi bactérienne qui se compose d'une couche de peptidoglycane d'une épaisseur approximative de 20 à 80 nm dans laquelle peuvent être enchâssées des acides téichoïques (polymères contenant du ribitol, du glycérol phosphate et des sucres) et des acides lipotéichoïques ancrés dans la membrane par leur partie lipidique. La paroi détermine la forme de la bactérie et lui permet de résister à la pression osmotique. Cette paroi, selon la bactérie considérée, peut être elle-même surmontée d'une capsule polysaccharidique d'épaisseur variable (présente chez toutes les souches virulentes de pneumocoques). Chez les bactéries Gram-négatif, la couche de peptidoglycane, plus fine (10-20 nm), est recouverte par une membrane externe dans laquelle sont présentes des protéines et des lipopolysaccharides, qualifiés d'endotoxines pour leurs propriétés inflammatoires chez leurs hôtes. Chez le pneumocoque, la paroi a une épaisseur de 20 nm et se compose d'un maillage de peptidoglycane représentant une plateforme d'ancrage pour de nombreuses protéines de surface et pour les acides téichoïques et lipotéichoïques. Il est à noter qu'en plus des bactéries Gram-positif et Gram-négatif, un troisième groupe peut être défini: les bacilles

acido-acoole-résistants (BAAR) qui sont le plus souvent non observables en coloration de Gram (mais apparaissent parfois Gram-positif). Les BAAR sont les membres de la famille des mycobactéries, dont la propriété de résistance à la coloration est liée à la structure même de leur paroi cellulaire qui forme une véritable enveloppe cireuse et protectrice, du fait de sa richesse exceptionnelle en acides gras et lipides (23 % pour 1-2 % chez les autres bactéries). Cette paroi est composée de peptidoglycane relié de façon covalente à un hétéroside : l'arabinogalactane, lui-même estérifié par des acides mycoliques, acides gras particuliers à très longue chaîne qui forment alors des cires. On trouve également une couche externe similaire à une capsule et composée de lipides, de polyosides et de protéines (Figure I-14).

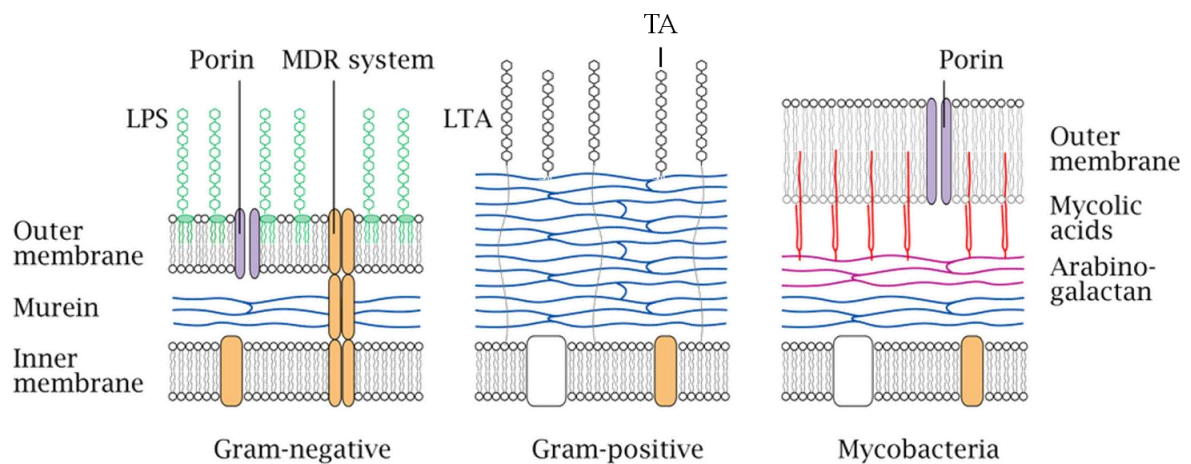


Figure I-14 : Représentation schématique de la surface des bactéries Gram-positif, Gram-négatif et des BAAR

I-vi-1-a- Capsule

Dès 1881, Pasteur note la présence d'une fine couche d'un composant de nature non identifiée localisée à la surface du pneumocoque, qui sera plus tard défini comme la capsule polysaccharidique [226]. Dochez et Avery parviennent à isoler ce matériel biologique qu'ils supposent protéique, comme tous les composés présentant un pouvoir antigénique identifiés jusqu'alors [227]. Finalement, en 1925 Avery démontre que la capsule est en réalité constituée de polysaccharides dont l'épaisseur varie entre 200 et 400 nm selon les souches [228, 229]. Bien que les mécanismes de liaisons de la capsule au peptidoglycane ne soient pas encore totalement élucidés, il apparaît que ces deux composants soient liés de manière covalente l'un à l'autre [230]. La capsule est un polymère composé par la répétition d'unités mono- ou oligosaccharidiques plus ou moins complexes (polymères branchés, chaînes latérales additionnelles). Dix-huit saccharides différents et groupements associés sont retrouvés dans

les différents types de capsule. Les sérotypes capsulaires identifiés diffèrent dans leur composition en polysaccharides et au niveau des liaisons qui les unissent [231]. Le système de nomenclature des sérotypes actuellement utilisé tient compte de la composition en polysaccharides et donc des caractéristiques antigéniques et structurales capsulaires. Les 94 sérotypes sont ainsi classés en 46 sérogroupes (1 à 46 avec seuls les sérogroupes 26 et 30 non représentés) associés à une lettre A, B ou C qui est fonction de la spécificité antigénique. Enfin dans un même séro groupe les lettres F (First désignant le premier sérotype d'un séro groupe), L (Lederle), N (Neufeld) et V (Valdemar) peuvent désigner le sérotype considéré [232]. Malgré la diversité capsulaire, tous les gènes impliqués dans la synthèse sont organisés de façon similaire dans un locus génétique *cps*. Les quatre premiers gènes du locus *cps* (*cpsA-D*) sont communs à tous les sérotypes, à l'exception des sérotypes 3 et 37. Les protéines codées par ces gènes ont toutes été définies comme des protéines de régulation de la synthèse capsulaire [233]. La région centrale du locus *cps* comprend des gènes qui codent pour des glycosyltransférases qui assemblent les unités oligosaccharidiques sur le lipide accepteur. Cette région centrale contient également le gène codant pour une flippase (Wzx) qui transfère les unités oligosaccharidiques vers la face externe de la membrane plasmique ainsi que le gène codant pour la polymérase (Wzy) qui lie les unités polysaccharidiques les unes aux autres (Figure I-15). Enfin, les gènes codant pour les enzymes indispensables à la synthèse et l'activation des précurseurs oligosaccharidiques sont localisés à la fin du locus *cps*. La biosynthèse de la capsule semble régulée par trois protéines: CpsB, CpsC et CpsD. CpsB est une phosphotyrosine phosphatase (dépendante du manganèse). CpsC est une protéine membranaire qui interagit avec la polymérase des polysaccharides capsulaires (Wzy). Enfin, CpsD est une tyrosine kinase dont la fonction d'autophosphorylation est activée via l'interaction avec CpsC. Morona et ses collaborateurs suggèrent que la phosphorylation de CpsD régulerait négativement la production de capsule [233-235]. Au contraire, selon les travaux de Bender et de ses collègues la phosphorylation de CpsD mènerait à une augmentation de la biosynthèse de la capsule [236]. Bien que ces résultats soient contradictoires il n'en demeure pas moins que la phosphorylation de CpsD est un élément central de la régulation de l'expression de la capsule.

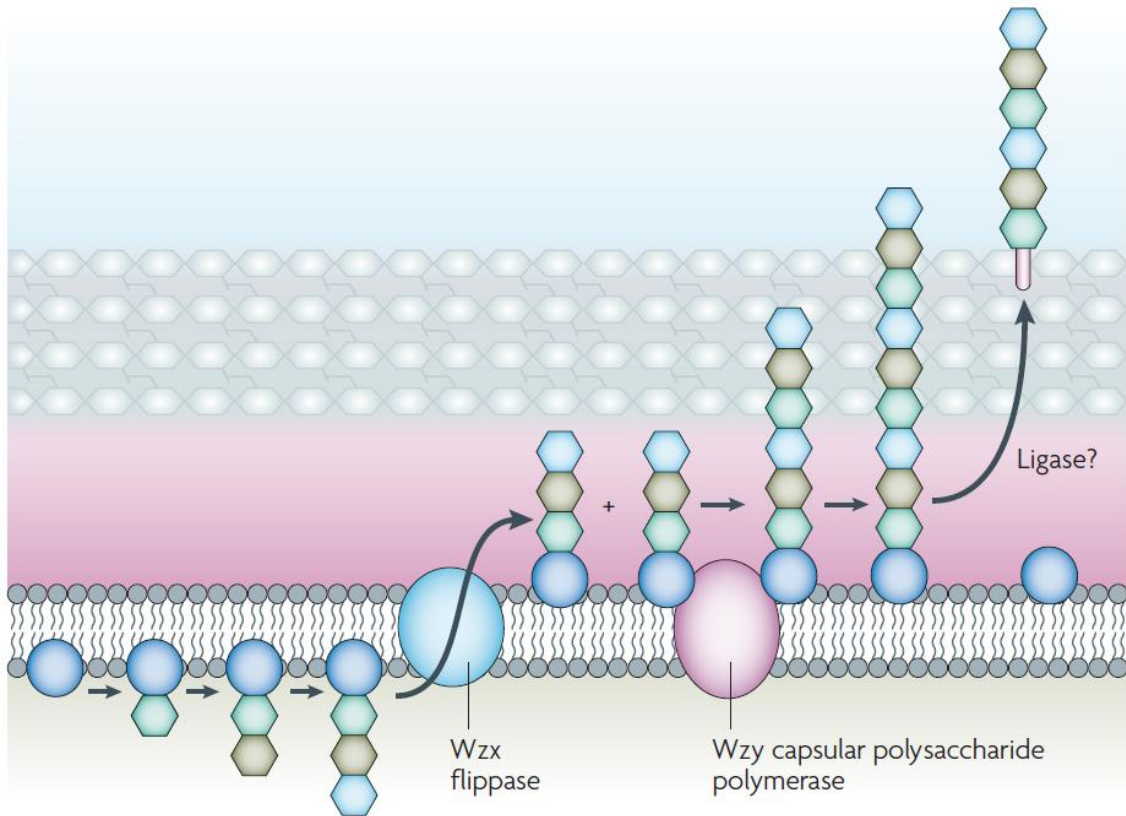


Figure I-15 : Biosynthèse de la capsule du pneumocoque [312]

La biosynthèse de la capsule est régulée par le locus *cps* qui code : les glycosyltransférases qui assemblent les répétitions oligosaccharidiques sur le lipide accepteur du côté cytoplasmique de la membrane ; la flippase Wzx qui transporte les unités oligosaccharidiques du côté externe de la membrane ; la polymérase Wzy qui assemble le polysaccharide capsulaire. Le locus *cps* code également les enzymes responsables de la synthèse des précurseurs saccharidiques activés ainsi que des gènes impliqués dans la régulation.

I-vi-1-b- Peptidoglycane

Le peptidoglycane est formé par des chaînes glycanes, composées par l'alternance de résidus *N*-acetyl-glucosamine (NAG) et *N*-acetyl-muramique (NAM) reliées entre elles par des liaisons osidiques β 1-4. Ces polymères saccharidiques sont réticulés, au niveau des groupements *D*-lactyl du résidu NAM, par des pentapeptides dont la séquence contient des acides-aminés de série L et D (L-Ala-D- γ -Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala) (Figure I-16). Le lipide II est le précurseur du peptidoglycane et se compose d'une chaîne aliphatique undecaprenol couplée, via un pyrophosphate, au NAM-pentapeptide, lui-même associé à un groupement NAG. Le lipide II est produit dans le cytoplasme puis est exporté du côté extracellulaire par la flippase FtsW [237], où il est alors pris en charge par des glycosyltransférases membranaires qui catalysent l'élongation de la chaîne glycan. Des transpeptidases interviennent également pour former des liaisons peptidiques entre le résidu L-Lys d'une première chaîne et le premier

résidu D-Ala d'une autre chaîne (Figure I-17). Ces réactions conduisent à la réticulation tridimensionnelle du peptidoglycane, lui conférant ainsi des propriétés de résistance et d'élasticité qui permettent à la bactérie de résister aux fortes variations de pressions osmotiques internes et externes auxquelles elle est soumise.

Les protéines qui catalysent les réactions de glycosyltransfert et de transpeptidation permettant d'obtenir le maillage tridimensionnel du peptidoglycane sont appelées PBP (pour Penicillin Binding Proteins). Ces enzymes ont en effet été identifiées comme cibles de la pénicilline, antibiotique de la classe des β -lactamines, avant même que leur fonction physiologique dans la synthèse du peptidoglycane ne soit comprise [238-240]. L'intégrité du peptidoglycane est un élément essentiel à la survie de la bactérie : l'inhibition de sa synthèse est donc létale, expliquant le succès des antibiotiques de la famille des β -lactamines. Ces molécules se lient de façon covalente à la sérine active du site catalytique des domaines transpeptidases des PBP et inhibent la réaction de transpeptidation. Découvert plus récemment, la vancomycine, antibiotique de la classe des glycopeptides, inhibe les activités glycosyltransférases et transpeptidases mais en se liant à la Lysine du pentapeptide du lipide II, bloquant la reconnaissance de l'enzyme pour son substrat. Afin de maintenir l'intégrité des cellules filles lors de la division bactérienne, la synthèse du peptidoglycane doit être coordonnée aux processus d'invagination de la membrane et de ségrégation de l'ADN [241].

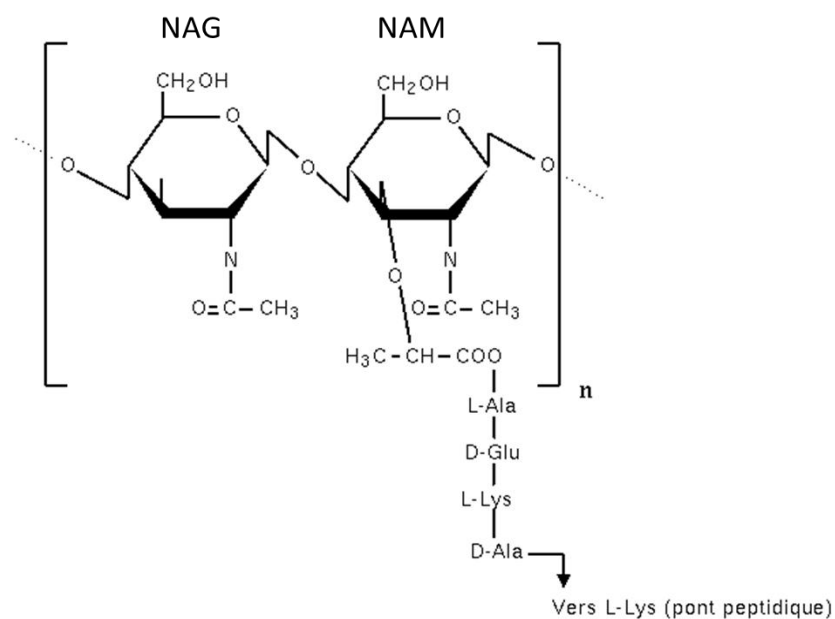


Figure I-16 : Représentation schématique de l'unité de base du peptidoglycane

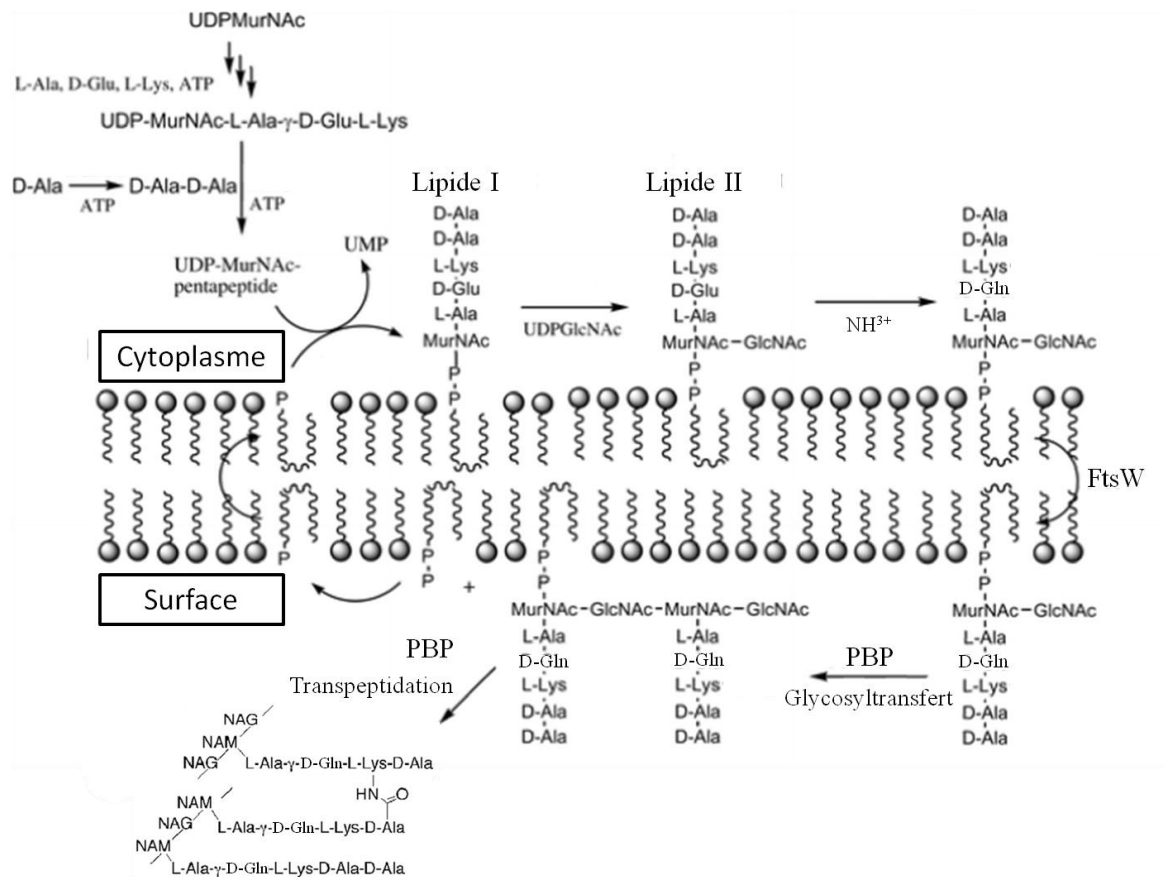


Figure I-17 : Biosynthèse du peptidoglycane du pneumocoque

Les monomères NAG-NAM-pentapeptide formant le peptidoglycane sont synthétisés dans le cytoplasme puis attachés à une chaîne aliphatique undecaprenol pour former le précurseur lipide II. Le lipide II est exporté du côté extracellulaire par la flippase FtsW et pris en charge par les PBP dont les activités glycosyltransférases et transpeptidases assurent respectivement l'élongation et la réticulation des chaînes de peptidoglycane.

I-vi-1-c- Acides teichoïques et lipoteichoïques

Dès 1930, les acides teichoïques (TA) et lipoteichoïques (LTA) étaient qualifiés respectivement de polysaccharide C et lipocarbohydrate (ou antigène F) et leur similarité structurale décrite [242, 243]. Leur découverte par Tillett à cette époque est liée à celle de la CRP, qui a d'abord été caractérisée pour sa capacité à lier les acides teichoïques [244]. Chez le pneumocoque, les TA et LTA sont formés de chaînes composées d'éléments de répétitions identiques dont le motif est : D-Glucose, 2-acetamido-4-amino-2,4,6-trideoxy-D-Galactose, N-Acetyl-D-Galactosamine (2x), ribitol-5- phosphate. Ces séquences sont liées les unes aux autres par un pont phosphodiester entre l'oxygène en position 5 du ribitol et l'oxygène en position 6 du résidu glucosyl de la répétition adjacente. Ce modèle a été remis en question récemment, et un nouveau modèle est proposé dont le motif répété contient les mêmes composants que le précédent mais organisés différemment : N-Acetyl-D-Galactosamine (2x), ribitol-5-phosphate, D-Glucose, 2-acetamido-4-amino-2,4,6-trideoxy-D-Galactose (Figure I-

18) [245]. Ce nouveau modèle semble plus en accord avec les masses moléculaires observées en spectrométrie de masse des TA et LTA du pneumocoque. Les TA sont liés à 15 - 30% des NAM du peptidoglycane via des liaisons phosphodiester alors que les LTA sont liés à la membrane plasmique par un ancrage lipidique [246]. Une particularité des TA et LTA du pneumocoque, mais également retrouvée chez *S. oralis* ou encore *H. influenzae*, est la présence de résidus phosphorylcholines liés par une liaison phosphodiester à l'oxygène en position 6 du résidu N-Acetyl-D-galactosaminyl [247, 248]. Par ailleurs, le nombre de résidus phosphocholines par répétition est dépendant des souches considérées. À titre d'exemple chez la souche R6, la majorité des répétitions porte deux résidus phosphocholines alors que chez la souche Rx1, seul un résidu phosphocholine est présent par répétition [249].

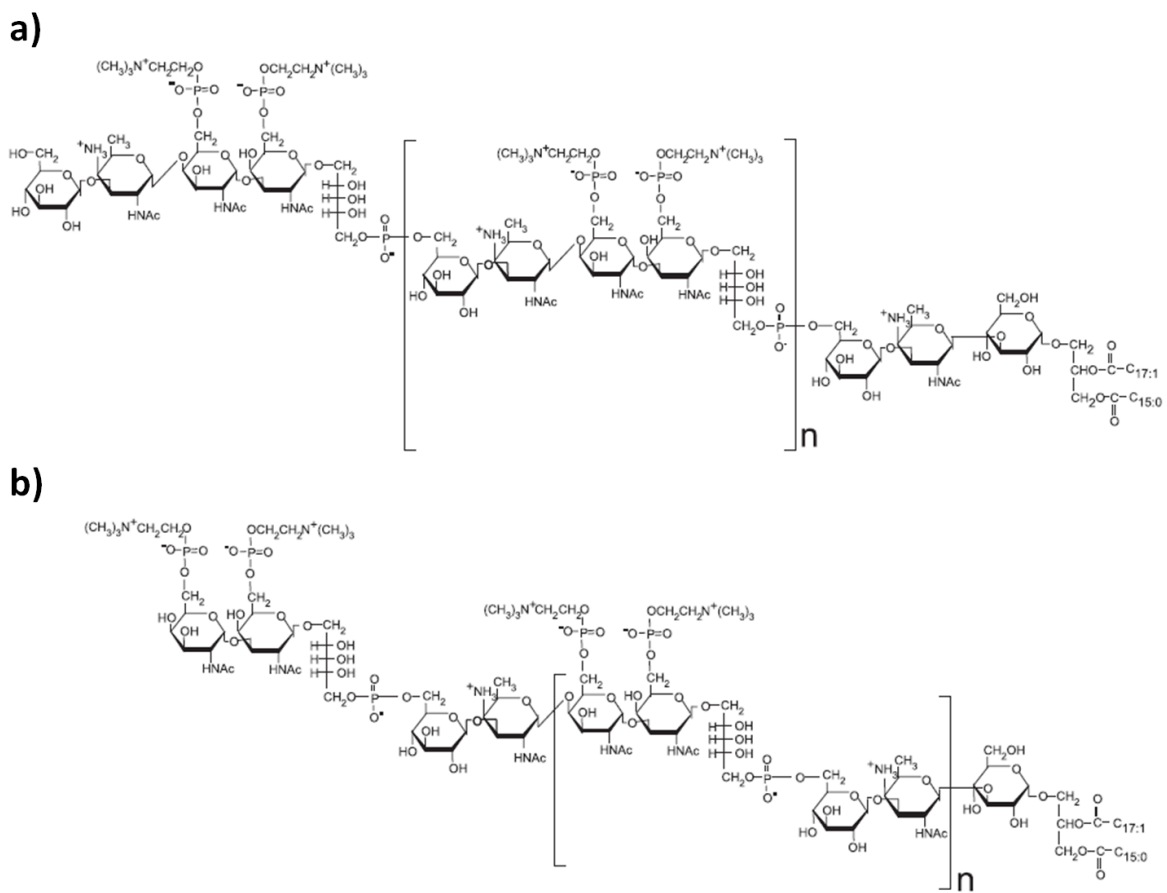


Figure I-18 : Modèles de la structure des TA / LTA du pneumocoque

a) Modèle communément accepté, b) nouveau modèle proposé en 2008 [245].

I-vi-2- Protéines associées à la surface du pneumocoque

De nombreuses protéines sont localisées en surface du pneumocoque, qu'elles soient sécrétées, ancrées à la membrane ou liées à la paroi. Les protéines de surface peuvent être classées en plusieurs grands groupes. On retrouve évidemment chez le pneumocoque des protéines transmembranaires dotées d'un peptide signal permettant leur synthèse à travers la membrane et ancrées dans la membrane par un ou plusieurs segments hydrophobes, ainsi que des protéines sécrétées grâce à un peptide signal. Les autres groupes réunissent des protéines qui présentent un peptide signal permettant leur export à travers la membrane plasmique et un motif d'ancrage spécifique dont la séquence est très conservée: les protéines LPxTG, les Choline-binding proteins (CBP) et les lipoprotéines.

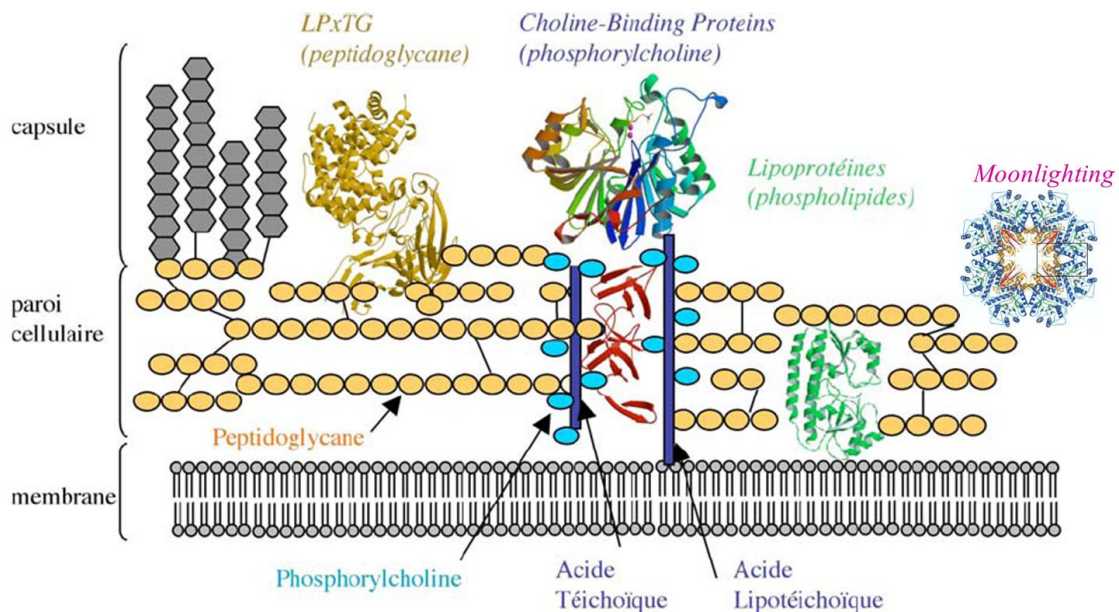


Figure I-19 : Protéines associées à la surface du pneumocoque

Différentes classes de protéines sont associées à la surface du pneumocoque. Les lipoprotéines sont ancrées à la membrane grâce à un pont thioester formé avec un diacylglycérol. Les protéines à Motifs LPxTG sont liées de manière covalente au peptidoglycane par un pont peptidique. Les CBP se fixent de manière non covalente aux résidus phosphocholine portés par les acides téichoïques et lipotéichoïques. Les mécanismes d'association à la surface des protéines « moonlighting » n'ont jusqu'à maintenant pas été décrits.

Plusieurs génomes de souches de pneumocoques ont été totalement séquencés et sont actuellement disponibles : R6, D39, TIGR4, Hungary 19A-6, JJA, 70585, P1031 et Taïwan 19F-14. De par la conservation des motifs de liaison à la paroi des protéines LPxTG, CBP et lipoprotéines, et grâce à l'utilisation d'outils bioinformatiques pour définir les peptides signaux, il est possible d'identifier l'ensemble des protéines présentes en surface de chacune de ces souches de pneumocoque. Par exemple, le séquençage de la souche de référence R6 en

2001 indiquait que 471 protéines sont potentiellement localisées en surface de la bactérie (tout mode de fixation à la paroi confondu) car présentant dans leur séquence un signal peptide [250]. Il est important de noter que ce nombre ne tient pas compte des protéines membranaires, ni d'un autre groupe de protéines exportées en surface qui ne présentent pas de peptide signal, ni aucun motif spécifique d'ancrage et qui sont en outre connues pour une fonction enzymatique dans le métabolisme bactérien. Les spécificités de ces protéines dites « moonlighting » seront décrites plus loin dans ce manuscrit. Il apparaît ainsi que le profil d'expression de protéines en surface de cette bactérie Gram-positif est extrêmement riche (Figure I-19). Les protéines de surface du pneumocoque sont pour la plupart non essentielles en culture *in vitro* et présentent diverses fonctions métaboliques, dans le transport de métaux par exemple, mais qui sont peu étudiés. Les protéines de surface les plus étudiées le sont du fait de leur implication dans les interactions avec l'hôte, propriétés les qualifiant de facteurs de virulence.

I-vi-2-a- Ancrage au peptidoglycane

En 1972, Sjöquist montre que la protéine A de *S. aureus* est liée de manière covalente à la paroi bactérienne [251] et en 1988, Pancholi et Fischetti font le même constat pour la protéine M de *S. pyogenes* et font une description partielle du mécanisme d'ancrage. Le motif LPxTG (L pour Leucine ; P pour Proline ; x pour acide aminé indifférent ; T pour Thréonine ; G pour Glycine) présent à l'extrémité C-terminale de la protéine est l'élément clé d'ancrage de la protéine au peptidoglycane et cette liaison par transpeptidation est catalysée par une enzyme membranaire appelée sortase [252, 253]. Les protéines LPxTG, ou plus précisément leurs précurseurs, présentent toutes la même organisation, à savoir un peptide signal à leur extrémité N-terminale qui leur permet d'être exportées à la membrane via la machinerie Sec et un CWSS (pour « Cell Wall Sorting Signal ») à leur extrémité C-terminale qui se compose du pentapeptide LPxTG, suivi d'une région hydrophobe qui sert d'ancrage membranaire et d'une queue cytoplasmique chargée positivement [254]. Schneewind et ses collaborateurs ont décrit le système d'ancrage des protéines LPxTG chez *S. aureus*. Leurs travaux révèlent que le motif LPxTG de la protéine A est clivé entre la thréonine et la glycine et que le groupement carboxylique de la thréonine est lié de manière covalente à une amine de la chaîne latérale du pentapeptide du précurseur du peptidoglycane, le lipide II [255, 256]. Le gène responsable de la fixation des protéines LPxTG au peptidoglycane est identifié comme étant *srtA* codant pour la sortase A, une protéine membranaire qui présente des orthologues chez toutes les bactéries Gram-positif [257-259]. Le processus de liaison covalente des

protéines LPxTG au peptidoglycane met en jeu plusieurs états intermédiaires. La première espèce P1 correspond au précurseur de la protéine présentant son peptide signal en N-terminal. Le clivage de ce peptide et l'export via la machinerie Sec mène à l'espèce P2, localisée dans la membrane, qui est prise en charge par la sortase. La reconnaissance du motif LPxTG et le clivage de la liaison peptidique entre les résidus T et G conduit à la formation de l'intermédiaire acyl-enzyme. Celui-ci subit une attaque nucléophile par une amine de la chaîne latérale du lipide II. Ce complexe covalent protéine-lipide II correspond à l'espèce P3 qui est pris en charge par les enzymes de synthèse du peptidoglycane, les PBP, pour être incorporé au réseau de peptidoglycane [260-262]. Ce modèle se base essentiellement sur l'étude de la sortase A de *S. aureus* mais reste néanmoins tout à fait acceptable pour les autres bactéries Gram-positif.

D'autres sortases ont également été découvertes, dont certaines ont une activité légèrement différente de la sortase A. Ainsi chez *S. pneumoniae* dans la souche TIGR4, 3 sortases SrtC-1, SrtC-2 et SrtC-3 sont codées dans un îlot de pathogénicité permettant la synthèse du pilus assemblé de manière covalente. Pour la polymérisation des pilines formant le pilus, l'amine permettant l'attaque nucléophile de l'acyl-enzyme est fournie par la piline suivante dans le polymère et non par le lipide II [263]. Des travaux menés au laboratoire par Lamya El Mortaji ont également montré que chacune de ces sortase reconnaît de manière préférentielle le motif LPxTG de l'une des piline (3 pilines différentes sont codés dans l'îlot de pathogénicité), et que chaque sortase catalyse la formation de pont entre différentes pilines. L'architecture du pilus est ainsi dépendante de l'action combinée des différentes sortases [264-267].

I-vi-2-b- Liaison aux acides téichoïques et lipotéichoïques

Une caractéristique unique du pneumocoque est son besoin nutritionnel en choline [247], qui est absorbée depuis le milieu de culture [268] et incorporée dans les unités répétées des TA et LTA [269]. Bien que le remplacement de la choline par de l'éthanolamine dans le milieu de culture satisfasse les besoins nutritionnels du pneumocoque, on observe diverses altérations fonctionnelles et morphologiques dans ces conditions. Il a ainsi été montré que les résidus phosphocholine des TA et LTA du pneumocoque sont essentiels pour l'activité d'hydrolases [270] et sont impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques [270, 271]. Ceci est dû au fait que les résidus phosphocholine servent d'ancrage à des protéines associées à la surface du pneumocoque : les protéines liant la choline (CBP pour choline

binding proteins) [272]. Les membres de la famille des CBP partagent une organisation modulaire consistant en un module biologiquement actif et un module liant la choline ou CBD (Choline-binding domain), qui permet l'ancrage à la paroi par une association non covalente aux résidus choline des acides téichoïques et lipotéichoïques. Le CBD, placé à l'extrémité C-terminale ou N-terminale, est formé par la répétition de motifs homologues d'une vingtaine d'acides aminés dont la séquence consensus est GWVKDNGTWYYLNSSGAMAT [273-275]. Afin de s'associer à la paroi, la plupart des CBP sont exportées du côté extracellulaire via la machinerie Sec. Par analyse des génomes des souches R6 et TIGR4, il a été identifié respectivement 10 et 15 gènes codants pour des CBP [75, 250, 276]. Les CBP sont parmi les protéines de surface les mieux caractérisées du pneumocoque, au niveau structural et fonctionnel, et également pour leurs propriétés antigéniques.

I-vi-2-c- Ancrage lipidique

Les lipoprotéines bactériennes sont modifiées à leur extrémité N-terminale par l'addition d'un groupe N-acyl-diacylglycérol qui les ancre à la membrane. Leur voie de biosynthèse est ubiquitaire chez les bactéries, ce qui reflète le rôle essentiel de ces lipoprotéines chez les bactéries. Toutes les protéines appartenant à la classe des lipoprotéines présentent à leur extrémité N-terminale un peptide signal pour l'export par le système Sec, suivi d'un motif consensus appelé Lipobox. Cette Lipobox est composée de 4 acides aminés : Lx_1x_2C , et constitue un site d'attachement covalent aux têtes polaires des phospholipides membranaires [277]. La Lipobox est reconnue par la peptidase de type II qui clive à la fois le peptide signal et le motif d'ancrage, entre le résidu x_2 et la cystéine, générant ainsi la lipoprotéine mature. La liaison covalente se forme alors entre ce résidu cystéine et la fonction hydroxyl des diacylglycérol (lipides membranaires) [278]. La peptidase de type II ou Lsp (pour Lipoprotein signal peptidase) n'a été identifiée que très récemment chez *S. pneumoniae* par analogie de séquence avec celle de *E. coli*, dans une étude qui a montré que Lsp est essentielle à la fonction d'un certain nombre de lipoprotéines du pneumocoque [279]. Grâce aux projets de séquençage de génomes, des analyses bioinformatiques recherchant la présence de la Lipobox ont permis de prédire l'existence de jusqu'à 46 lipoprotéines chez le pneumocoque [75, 250, 280]. Dans le génome de la souche TIGR4, parmi les 46 lipoprotéines prédites 26 sont des transporteurs de type ABC (pour ATP-binding cassette). La superfamille des transporteurs ABC a été identifiée dans les années 80 chez les eucaryotes, les procaryotes et les archaebactéries et intervient dans l'import et l'export de substrats variés [281, 282]. Ces transporteurs se composent de plusieurs protéines qui s'organisent selon une topologie

conservée : deux domaines transmembranaires (TMD pour TransMembrane Domain) générant un canal dans la membrane plasmique et deux domaines cytoplasmiques (NBD pour Nucleotide Binding Domain) qui sont impliqués dans l'hydrolyse de l'ATP, source d'énergie du transport [283]. Chez les bactéries, dans le cas des systèmes d'import, une troisième protéine extracellulaire est indispensable, le SBR (pour Substrate Binding Receptor). Celle-ci a pour rôle de fixer le substrat (ex: vitamines, ions...) présent dans l'environnement bactérien afin de le présenter au TMD du système ABC. Dans la souche TIGR4, 6 lipoprotéines sont ont été annotées comme des SBR [284]. Ces systèmes d'import sont essentiels pour la survie du pneumocoque car certaines de ses voies de biosynthèse sont incomplètes, il doit donc récupérer des nutriments de l'hôte, processus que les couples SBR/transporteurs ABC facilitent. Enfin 6 lipoprotéines sont impliquées dans des processus de repliement ou d'activation de protéines de surface du pneumocoque [280].

I-vii- Facteurs de virulence du pneumocoque

La pathogénicité est associée à des facteurs dits de virulence qui sont définis comme les composants du microorganisme qui endommagent l'hôte mais incluent aussi les composants essentiels à la viabilité du pathogène au sein de l'hôte infecté [285]. Ainsi, selon la niche colonisée, les facteurs de virulence peuvent présenter plusieurs types d'activités : la pénétration des épithélia, l'attachement à la surface des cellules ou à la matrice extracellulaire, l'invasion de compartiments intracellulaires, l'évasion du système immunitaire de l'hôte. Les mécanismes permettant à la bactérie d'adapter son métabolisme aux conditions rencontrées dans l'hôte, ou d'y assurer l'assimilation de nutriments rares suivant les conditions locales, peuvent également être considérés comme des facteurs de virulence. Cette partie du manuscrit se concentrera néanmoins sur les facteurs impliqués dans l'adhérence, l'invasion et l'échappement au système immunitaire. De nombreux facteurs de virulence du pneumocoque sont impliqués dans le processus de colonisation. L'adhésion à l'épithélium respiratoire est en effet essentielle pour l'établissement du pneumocoque dans le nasopharynx (décrit en I-ii-4). Il en va de même pour les mécanismes d'échappement au système immunitaire. Bien que le portage du pneumocoque soit asymptomatique, l'hôte n'en monte pas moins une réponse immunitaire similaire à celle mise en jeu pour une infection, mais d'envergure moins importante. La nature des facteurs de virulence des bactéries est variée. Il peut s'agir de protéines, de polysaccharides, de lipides ou de petites molécules qui vont être essentielles dans les interactions avec l'hôte.

I-vii-1- Capsule polysaccharidique

Comme décrit précédemment, 94 types de capsule structurellement et sérologiquement distincts ont été identifiés à ce jour. La plupart des sérotypes présentent des polysaccharides capsulaires chargés négativement au pH physiologique, qui forment une couche plus ou moins épaisse isolant la bactérie du milieu environnant [286]. Étant la couche la plus externe de la bactérie, la capsule représente la première barrière et joue donc un rôle important dans l'évasion du pneumocoque face aux mécanismes de défense de l'organisme. L'épaisseur et la charge de la capsule peut ainsi directement interférer dans les interactions avec les phagocytes, et donc empêcher la phagocytose [286]. L'activation du complément étant particulièrement mobilisée par le système immunitaire inné pour lutter contre la prolifération du pneumocoque, une fonction essentielle de la capsule est d'empêcher l'opsonisation de la bactérie par le fragment C3b, réduisant ainsi considérablement la phagocytose bactérienne par les neutrophiles [287-290]. Il était proposé que la capsule inhibe la phagocytose médiée par

C3b en bloquant physiquement les interactions entre C3b (supposé se fixer à des structures plus profondes telles que les TA et LTA et les protéines de surface) et les récepteurs en surface des phagocytes [291, 292]. Néanmoins des travaux plus récents suggèrent que la capsule peut aussi réduire la quantité totale de protéines du complément déposées sur la surface bactérienne [293]. Au final, il semble que ce soit la structure biochimique de la capsule, plus que son épaisseur, qui détermine le degré de protection qu'elle apporte face au complément [288, 294, 295]. Il a également été montré que le sérotype capsulaire influe sur le ratio C3b/iC3b déposé, ce qui montre que la capsule a également une influence sur le processus de dégradation de C3 [294]. Il apparaît de plus que les sérotypes communément invasifs déclenchent une réponse immunitaire réduite par rapport à des sérotypes plus rarement retrouvés durant les infections [296]. La présence de la capsule (ainsi que les charges apportées par les acides téichoïques et lipotéichoïques) est également responsable de la résistance du pneumocoque au NET, par un mécanisme encore mal compris [297].

L'expression de la capsule est ainsi une condition *sine qua non* de la virulence, les souches de pneumocoques non capsulées étant complètement avirulentes. Néanmoins, et malgré le rôle prépondérant de la capsule dans la virulence du pneumocoque, il apparaît clairement que des facteurs non capsulaires sont également importants pour la virulence. Ainsi des analyses d'épidémiologie moléculaire ont montré que, indépendamment de leurs sérotypes capsulaires, des propriétés associées à des types clonaux particuliers influence le potentiel du pneumocoque à causer des infections [298, 299].

I-vii-2- Pneumolysine

La pneumolysine est une protéine de 52 kDa retrouvée chez tous les isolats cliniques de pneumocoque, et est à ce jour le seul facteur de virulence protéique dont les activités ne sont pas liées à la surface de la bactérie. Cette protéine appartient à la famille des cytolysines dépendantes du cholestérol (CDC) car elle est capable de lyser toutes les cellules mammifères qui contiennent du cholestérol dans leur membrane.

Contrairement aux autres CDC la pneumolysine ne présente pas de peptide signal N-terminal permettant sa prise en charge par le système Sec. Le modèle traditionnel pour la libération de la pneumolysine dans le milieu a longtemps supposé qu'elle était due à la lyse massive des pneumocoques provoquée par l'action des autolysines durant la phase stationnaire. Ce modèle est cependant remis en question par le fait que la pneumolysine est libérée durant la phase de croissance dans certaines souches, soit bien antérieurement à la lyse

en phase stationnaire [300]. Plus récemment il a été proposé que la pneumolysine puisse être relarguée par la lyse des cellules non compétentes induite par le processus de transformation, ce qui serait plus en accord avec une libération de la pneumolysine en phase de croissance [70].

L'activité lytique de cette protéine se traduit par la formation de larges pores (260 angströms de diamètre) dans la membrane de la cellule cible, générés par l'oligomérisation de plus de 44 monomères de pneumolysine [301, 302]. Durant sa conversion du stade monomère soluble en oligomère membranaire, la pneumolysine subit des changements de conformation importants qui provoquent le déploiement d'une hélice α hydrophobe qui permet l'insertion dans la membrane [302]. Selon une étude menée sur des tissus neuronaux, la formation des pores par la pneumolysine induit une augmentation intracellulaire de calcium dans la cellule cible et le relargage d'un « Apoptosis-Inducing Factor » conduisant à la mort cellulaire [303, 304]. La pneumolysine peut également activer la voie classique du complément à distance du pneumocoque, via sa liaison au fragment Fc des immunoglobulines, ce qui permettrait de consommer des protéines du complément avant qu'elles ne puissent se fixer au pneumocoque [305, 306]. Mais la pneumolysine est aussi capable de diminuer les réponses immunitaires et inflammatoires de l'hôte par ses effets cytotoxiques directs sur les cellules phagocytaires [278]. Même à faible concentration la pneumolysine est capable d'inhiber le burst oxydatif des phagocytes, leur chimiotactisme et leur production de cytokines [307]. Des études ont montré que des souches de pneumocoque mutantes n'exprimant pas la pneumolysine sont moins virulentes que la souche de type sauvage, qu'elles soient inoculées chez la souris par voie nasale ou systémique [308, 309]. Dans des modèles d'infection pulmonaire, les souches mutantes induisent une inflammation moindre que celle générée par la souche parentale [310, 311]. De façon intéressante, une souche où la pneumolysine est mutée pour ses activités lytiques et d'activation du complément, apparaît plus virulente qu'une souche dans laquelle l'expression est abolie, suggérant que la pneumolysine présenterait une activité additionnelle, non identifiée à ce jour [312].

1-vii-3- Protéines de surface impliqués dans la virulence

Avant la publication en 1997 du premier génome de pneumocoque séquencé, le nombre de facteurs de virulence putatifs identifiés était relativement restreint [313]. Grâce aux travaux de séquençage accomplis sur le pneumocoque qui ont permis l'identification d'une large gamme de gènes à analyser, la priorité est maintenant passée de la recherche de gènes

impliqués dans la virulence à l'étude fonctionnelle de protéines. Comme détaillé précédemment, la surface du pneumocoque est décorée par de nombreuses protéines, certaines sont des facteurs de virulence impliqués soit dans les processus d'invasion, soit dans l'échappement au système immunitaire. Cette partie du manuscrit a pour objectif de faire un tour d'horizon des protéines de surface impliquées dans la virulence du pneumocoque, afin d'illustrer par quels mécanismes le pneumocoque envahit les tissus de son hôte et résiste à l'action du système immunitaire.

I-vii-3-a- Adhésion aux tissus hôtes et invasion

Afin d'assurer l'invasion des tissus de l'hôte, un ensemble de facteurs de virulence doit être exprimé de manière coordonnée par le pneumocoque. En effet durant le processus d'invasion le pneumocoque doit interagir avec les cellules épithéliales et endothéliales de l'hôte, puis traverser ces barrières afin de permettre sa dissémination. Pour faciliter l'adhésion, le pneumocoque exprime un ensemble de protéines, désignées sous le terme générique d'adhésines, qui interagissent avec des glycoconjugués ou des protéines présentés par différentes structures des tissus de l'hôte : matrice extracellulaire, glycocalyx, récepteurs cellulaires.

Pour un certain nombre de protéines de surface du pneumocoque, une fonction d'adhésion aux cellules de l'hôte a été proposé (par analyse bioinformatique à partir des génomes) ou mise en évidence (par des approches génétiques) sans que leurs ligands n'aient été à ce jour identifiés. C'est le cas des protéines à motif LPxTG PclA, et des CBP PcpA et CbpD [314].

Liaison aux glycoconjugués

Des glycoconjugués sont les premiers composants exposés par les cellules de l'hôte rencontrés par le pneumocoque, l'adhésion à ces sucres est donc la première étape pour l'interaction avec les cellules [315]. Plusieurs protéines présentes en surface du pneumocoque sont ainsi capables de reconnaître la N-acétylglucosamine (GlcNAc) et la N-acétylgalactosamine (GalNAc), des sucres présents dans les polysaccharides du glycocalyx ou de la matrice extracellulaire. Il a ainsi été montré que la protéine transmembranaire AmiD ainsi que des lipoprotéines telles que AmiA ou MsrA sont impliqués dans la reconnaissance de glycoconjugués GalNAc β 1-4Gal. La lipoprotéine PlpA permet la reconnaissance de glycoconjugués GalNAc β 1-3Gal et la protéine atypique SpxB est impliquée dans la liaison du pneumocoque aux glycoconjugués GalNAc β 1-4Gal, GalNAc β 1-3Gal, et au GlcNAc. Ces sucres sont présents en surface des cellules épithéliales pulmonaires et des cellules

endothéliales de l'hôte. Des mutants de délétion de ces différents gènes ont ainsi montré une diminution importante de leur capacité à se fixer à ces différents carbohydrates [316-318].

Liaison aux récepteurs cellulaires

Bien que l'attachement aux surfaces de l'hôte soit initié par des interactions avec des glycoconjugués, l'établissement d'une adhésion forte et avide implique la reconnaissance de protéines de l'hôte. Le pneumocoque est ainsi capable d'établir des interactions avec différents récepteurs en surface des cellules épithéliales et endothéliales. En premier lieu il a été montré que les résidus phosphocholine (PCho) des acides téichoïques et lipotéichoïques permettent au pneumocoque de se lier au récepteur du facteur d'activation plaquettaire (PAFr), qui est surexprimé par les cellules endothéliales activées [319]. Ces travaux ont en effet montré que la liaison du pneumocoque aux cellules endothéliales était inhibée par des antagonistes du PAFr ou des extraits purifiés de paroi du pneumocoque, et par des anticorps anti-PCho. Au delà de l'adhésion aux cellules de l'hôte, cette interaction permet au pneumocoque d'être internalisé par endocytose [319] puis libéré à l'autre pôle de la cellule par exocytose, un processus appelé transcytose [320]. Ce mécanisme permet la traversée des épithélia et endothélia par le pneumocoque. La pertinence de cette interaction a également été démontrée chez le lapin où un antagoniste du PAFr bloque la transition du pneumocoque depuis les alvéoles pulmonaires vers le sang [319].

La protéine PspC, également appelée CbpA ou SpsA, est considérée comme l'une des adhésines majeures du pneumocoque. PspC interagit avec le domaine extracellulaire du récepteur d'immunoglobulines polymériques (pIgR) qui est fortement exprimé par les cellules de l'épithélium pulmonaire [321, 322]. Il a été montré *in vitro* que cette interaction permet la translocation du pneumocoque au travers de cellules de l'épithélium nasopharyngé humain par transcytose. Cette translocation est inhibée par des anticorps anti-PspC ou anti-pIgR et est également impossible pour un mutant de délétion de PspC [323]. Il a également été montré que la lipoprotéine PsaA est impliquée dans l'adhésion du pneumocoque aux cellules épithéliales [324]. PsaA semble reconnaître la E-cadhérine exprimée par les cellules épithéliales, comme cela a été montré par des interactions entre les formes recombinantes de ces deux protéines [325].

Liaison à la matrice extracellulaire

Il apparait qu'un large panel de protéines de surface exprimées par le pneumocoque interagit avec des protéines de la matrice extracellulaire, cette capacité de liaison à la matrice semble essentielle pour la colonisation et l'invasion. Parmi les protéines humaines reconnues, certaines ne sont la cible que d'un ou quelques récepteurs de surface du pneumocoque, la kératine est ainsi reconnue par la protéine à motif LPxTG PstP [326], la laminine est la cible de CbpE et de RrgA (adhésine du pilus) [276, 327]. Les collagènes, extrêmement abondants dans la matrice extracellulaire, sont quant à eux reconnus par un nombre plus important de protéines, ils semblent donc représenter une cible importante pour le pneumocoque. Parmi les protéines ayant montré des interactions avec les collagènes on trouve CbpL [276] et les protéines à motif LPxTG RrgA, PrtA, ZmpB et NanA [276, 327]. En liant des protéines de la matrice extracellulaire, le pneumocoque exploite également indirectement les intégrines présentes en surface des cellules de l'hôte pour y adhérer. Les intégrines sont des protéines ubiquitaires permettant d'ancrer les cellules à la matrice, les protéines de la matrice présentant le tripeptide RGD qui permet la liaison aux intégrines peuvent ainsi servir d'intermédiaire dans l'adhésion du pneumocoque. Il a été montré que la fibronectine peut lier 5 à 10 intégrines différentes [328, 329] et le pneumocoque utilise la fibronectine pour assurer une adhésion efficace aux cellules épithéliales et endothéliales de l'hôte. Il a ainsi été mis en évidence des interactions entre la fibronectine et de nombreuses protéines de surface du pneumocoque : CbpE, CbpG, les protéines à motif LPxTG RrgA, PfbA et PavB, les protéines atypiques PavA et émolase [276, 330-335].

Adhésines et glycosidases

Le pneumocoque est ainsi capable de reconnaître de nombreuses protéines afin d'adhérer aux cellules de l'hôte, il est cependant concevable qu'il doive, pour atteindre la surface des cellules, dégrader les glycoconjugués qui y sont associés. À cette fin le pneumocoque est équipé d'un ensemble d'exoglycosidases associées à la surface qui lui permettent, grâce à leurs différentes activités, de dégrader séquentiellement les glycoconjugués qu'il rencontre. Parmi les protéines capables de dégrader les glycoconjugués présentes en surface dont l'activité a été démontré on trouve les neuraminidases NanA et NanB, la bêta-galactosidase BgaA, l'acétyl-glucosaminidase StrH et la hyaluronidase Hyl, qui sont toutes des protéines à motif LPxTG. Il a été montré que l'action de ces enzymes permet au pneumocoque de dégrader les glycoconjugués en surface des cellules de l'hôte et facilitent ainsi l'adhésion et l'invasion en exposant les récepteurs de surface de ces cellules [336-338]. La présence

d'autres glycosidases de surface est prédite à partir des génomes séquencés de pneumocoques, par exemple la neuraminidase NanC, l'acétyl-galactosaminidase Eng et l'endoexoaminidase EndoD [339-341]. Néanmoins aucune preuve de l'implication de ces protéines dans les processus d'adhésion et d'invasion n'a pour l'instant été apportée.

Adhésines et protéases

Les glycoconjugués ne sont cependant pas les seules structures pouvant empêcher l'accès du pneumocoque à la surface des cellules. Ainsi, bien que le pneumocoque soit capable de lier nombre de protéines de la matrice extracellulaire, cette même matrice est en mesure de limiter les interactions entre la bactérie et les cellules de l'hôte. On peut donc légitimement s'attendre à ce que le pneumocoque exprime des protéases capables de dégrader des constituants de la matrice afin de faciliter l'adhésion. Des protéases à sérines associées à la surface ont effectivement été identifiées, il s'agit des protéines à motif LPxTG HtrA, PrtA, ZmpA, ZmpB et ZmpC. Néanmoins aucune activité protéolytique contre des éléments de la matrice n'a été mise en évidence pour ces protéines, leur rôle reste donc pour l'instant peu clair. Il a cependant été montré que ZmpC est capable de cliver et ainsi d'activer la métalloprotéase matricielle MMP-9 [342], qui est capable de dégrader diverses protéines de la matrice extracellulaire telles que des collagènes [343]. L'importance de cette activité de ZmpC est soulignée par le fait que l'inactivation du gène *zmpC* diminue la virulence du pneumocoque chez la souris [342].

Adhésines et plasminogène

L'utilisation d'activités protéasiques de l'hôte par le pneumocoque ne se limite cependant pas à MMP-9. Plus particulièrement ces dernières années le recrutement du plasminogène (Plg) à la surface des bactéries a émergé comme un mécanisme central dans les interactions hôte / pathogène. Démontrée pour la première fois en 1987 chez *S. pyogenes* [344], cette capacité de recrutement du plasminogène a maintenant été mise en évidence chez de nombreuses bactéries et également chez des parasites [345, 346]. Le plasminogène est un zymogène de 92 kDa présent dans le plasma et les liquides extracellulaires à une concentration d'environ 2 μ M, son activation conduit à la formation de la plasmine (Pl), une protéase à sérine [347]. La plasmine est capable de dégrader une grande variété de protéines : fibrine (caillots sanguins), matrice extracellulaire (ex : fibronectine, laminine), tissus connectifs, protéines d'adhésion et active des collagénases [348]. La plasmine contribue également à une boucle d'amplification en clivant la forme inactive de l'activateur du

plasminogène de type urokinase (pro-uPA), générant la forme active uPA ce qui accroît l'activation du plasminogène et augmente la quantité de plasmine. Cette boucle d'amplification provoque une augmentation significative de l'activité plasmine dans les systèmes biologiques [349]. L'importance du recrutement de plasminogène à la surface bactérienne est souligné par le fait que, chez divers pathogènes comme *S. pyogenes* ou *Leptospira interrogans*, de multiples récepteurs ont été découverts [350-353]. Chez le pneumocoque, les protéines capables de fixer le plasminogène sont variées. Il a ainsi été montré au laboratoire que CbpE est responsable d'une part importante de la fixation du plasminogène par le pneumocoque, et que le plasminogène ainsi fixé pouvait être converti en plasmine [354]. Des protéines à motif LPxTG telles que PfbA et PfbB montrent également des capacités de liaison à la plasmine [333, 355]. Les plus nombreuses protéines interagissant avec la plasmine à la surface du pneumocoque restent cependant des protéines atypiques ou « moonlighting », il a en effet montré que la GAPDH, l'énolase, PavB et PepO sont capables de lier le plasminogène [356-359]. Le rôle de la plasmine à la surface du pneumocoque a été démontré par différentes études. Il a ainsi été mis en évidence que le recrutement de la plasmine facilite la migration du pneumocoque à travers la matrice extracellulaire, la pénétration d'une lame basale reconstituée étant beaucoup plus rapide en présence de plasminogène qu'en son absence [360]. Des preuves supplémentaires ont été apportées au sein du laboratoire, les travaux de Cécile Attali ayant montré que la délétion de *cpbE* limite fortement la capacité du pneumocoque à traverser la matrice en présence de plasminogène [354]. Les travaux de Cécile Attali ont également montré que le recrutement de la plasmine en surface du pneumocoque augmente l'adhésion aux cellules de l'hôte, ce qui semble confirmer que la dégradation de la matrice permet de rendre accessible des récepteurs cellulaires nécessaires à l'adhésion du pneumocoque. Ces travaux ont de plus mis en évidence que la plasmine permet de faciliter l'invasion en dégradant les jonctions intercellulaires, notamment la VE-cadhérine, ce qui permet la transmigration de la bactérie à travers des épithélia et endothélia [361]. Il apparaît ainsi que le recrutement d'activités protéases de l'hôte à la surface bactérienne représente un mécanisme particulièrement efficace pour augmenter les capacités d'invasion du pneumocoque.

Conclusion

Il est possible de schématiser le processus d'adhésion et d'invasion du pneumocoque de la manière suivante (Figure I-20). Comme expliqué précédemment, lorsque le pneumocoque entre en contact avec des cellules constituant les barrières de l'hôte (cellules épithéliales,

endothéliales), l'épaisseur de la capsule est réduite par un mécanisme inconnu. Cette diminution de taille de la capsule facilite les interactions entre les adhésines du pneumocoque reconnaissant des sucres et les glycoconjugués, associés à la matrice et la surface des cellules, initiant ainsi le processus d'adhésion. Des adhésines du pneumocoque sont capables de reconnaître des protéines de la matrice extracellulaire, renforçant les interactions entre la bactérie et les tissus de l'hôte. En parallèle, afin de faciliter l'adhésion aux récepteurs présents en surface des cellules, les exoglycosidases de surface du pneumocoque peuvent cliver les glycoconjugués, tandis que le recrutement de protéases de l'hôte permet de dégrader les composants de la matrice extracellulaire. Ces deux activités hydrolytiques conjuguées dégagent l'accès à la surface cellulaire sur laquelle se fixe le pneumocoque. L'adhésion du pneumocoque peut être suivie par la traversée des épithélia ou endothélia, soit à travers les cellules en exploitant le mécanisme de transcytose, soit entre les cellules par dégradation protéolytique des jonctions intercellulaires. La production par le pneumocoque de peroxyde d'hydrogène endommageant les cellules peut également faciliter le passage intercellulaire en déstabilisant les épithélia [362], tout comme les dégâts dus à la réaction inflammatoire de l'hôte.

Il est à noter que la présence de ces facteurs de virulence est variable en fonction des souches de pneumocoque. Si certains sont ubiquitaires, d'autres ne sont retrouvés que dans certaines souches. Par exemple, toutes les souches de pneumocoque possèdent le gène *nanA*, la plupart également *nanB*, mais seuls 50% présentent le gène *nanC*. Ces variations pourraient en partie expliquer les différences de virulence entre les souches de pneumocoque.

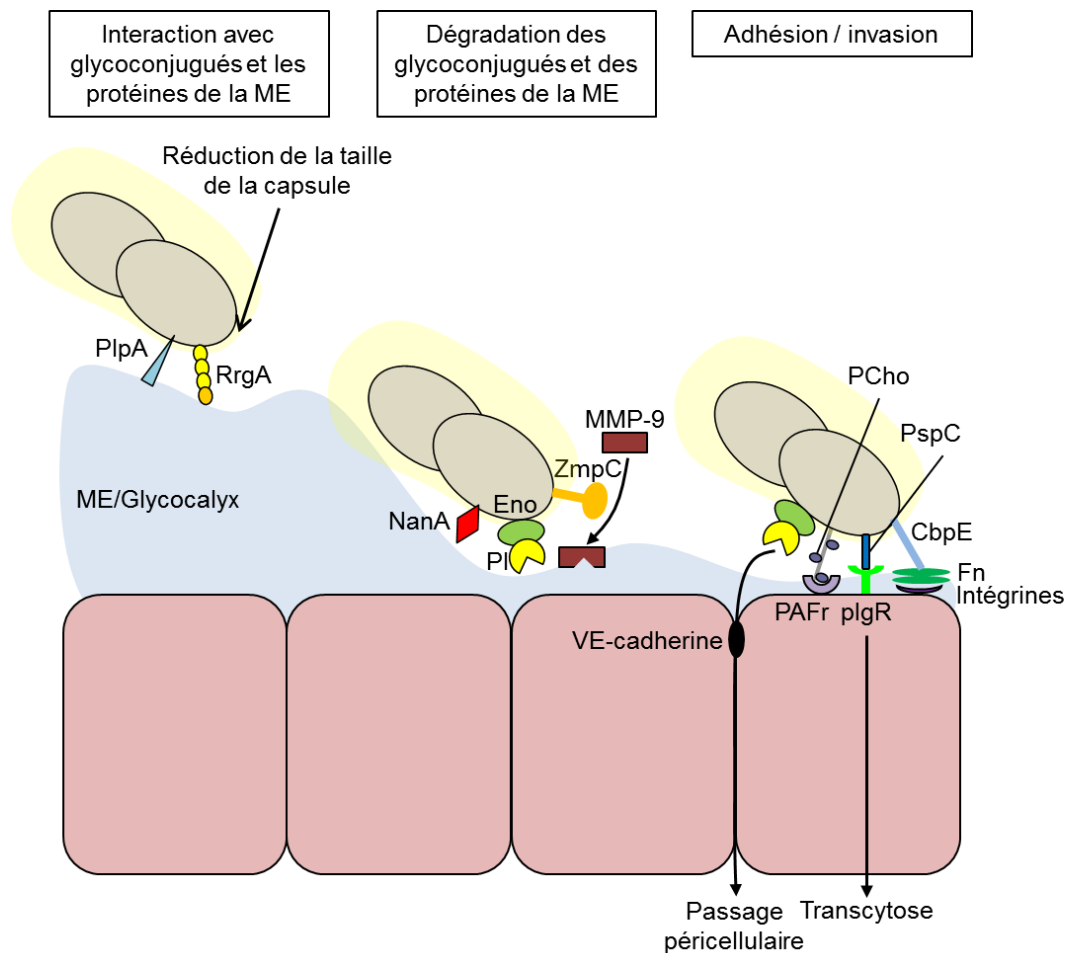


Figure I-20 : Schéma du processus d'adhésion et d'invasion du pneumocoque

Au contact de cellules de l'hôte l'épaisseur de la capsule est réduite pour faciliter les interactions, des adhésines du pneumocoque se fixent aux glycoconjugués et aux protéines composant la matrice. Les exoglycosidases de surface du pneumocoque clivent les polysaccharides et le recrutement de protéases de l'hôte permet la dégradation des protéines de la matrice, dégageant l'accès à la surface cellulaire. Au contact des cellules, l'adhésion est assurée par des interactions avec de multiples récepteurs. L'adhésion du pneumocoque peut être suivie par la traversée des épithélia ou endothélia, soit à travers les cellules en exploitant le mécanisme de transcytose, soit entre les cellules par dégradation protéolytique des jonctions intercellulaires.

ME : matrice extracellulaire, PI : plasmine, Fn : fibronectine.

I-vii-3-b- Échappement au système immunitaire

Comme détaillé précédemment, la capsule joue un rôle essentiel dans la protection contre le système immunitaire, mais le pneumocoque exprime également plusieurs protéines qui lui permettent de limiter les effets de certains mécanismes de défense de l'hôte.

Au niveau des muqueuses respiratoires, les seuls anticorps présents sont des immunoglobulines sécrétées de classe A, qui sont exportées par transcytose grâce au récepteur pIgR. Les IgA forment une barrière empêchant la plupart des pathogènes de se lier aux cellules des muqueuses. Pour contrer l'effet des IgA, le pneumocoque exprime la métallo-

protéase à zinc ZmpA, une protéine à motif LPxTG aussi appelée IgA1 protéase. Cette protéase cible les IgA1, qui constituent plus de 90% des IgA dans les voies respiratoires [363]. Le clivage des IgA1 fixées au pneumocoque laisse des fragments Fab, qui ne sont plus opsonisants sans la partie Fc, liés aux antigènes de surface de la bactérie, les protégeant d'une reconnaissance ultérieure par d'autres anticorps. De plus l'action de l'IgA1 protéase a une conséquence inattendue puisque les fragments Fab restants après clivage augmentent l'adhésion du pneumocoque aux cellules épithéliales, un effet aboli dans les mutants de délétion de *zmpA* [364].

Parmi les cellules immunitaires impliquées dans la réponse au pneumocoque, les neutrophiles sont les phagocytes les plus nombreux recrutés au site d'infection. En plus de leur rôle dans la phagocytose, les neutrophiles sont également capables de piéger les pneumocoques grâce à leur NET. Bien que le pneumocoque, contrairement à d'autres pathogènes, ne soit pas détruit par l'activité bactéricide du NET, il pourrait néanmoins empêcher l'invasion et la dissémination bactérienne, et ainsi permettre de confiner l'infection. De nombreuses souches de pneumocoque expriment une endonucléase de surface EndA [365], qui permet de dégrader l'ADN constituant le NET, permettant ainsi au pneumocoque d'y échapper et favorisant l'invasion [94].

Comme mentionné précédemment, le système du complément est un élément essentiel dans la réponse immunitaire face au pneumocoque. Il n'est donc pas étonnant que, parmi les protéines de surface du pneumocoque impliquées dans l'échappement au système immunitaire, un nombre important d'entre elles participent à l'inhibition de l'action du complément. Il a en particulier été montré que la CBP PspC et la protéine à motif LPxTG Hic interagissent avec le facteur H [366, 367]. Celui-ci inhibe l'activation de la voie alterne, son recrutement en surface du pneumocoque permet donc de limiter le dépôt de C3b et la phagocytose [368]. L'importance de PspC pour la résistance du pneumocoque face à l'action du complément a été montrée dans un modèle d'infection systémique chez la souris [369]. Un autre régulateur soluble du complément est la protéine C4BP, qui inhibe l'activation de la voie classique. Récemment, il a été mis en évidence que le pneumocoque, en plus de recruter le facteur H, est également capable de fixer C4BP. Des travaux ont ainsi montré que certains variants alléliques de PspC interagissent avec C4BP, permettant le recrutement de ce régulateur en surface du pneumocoque et limitant ainsi l'activation de la voie classique du complément [370]. Un autre récepteur de surface pour C4BP a également été découvert, il s'agit de la protéine atypique émolase. Il a été démontré que l'émolase du pneumocoque

interagit avec C4BP, et que la C4BP liée à l'énolase conserve son activité d'inhibition de la C3-convertase [371]. De plus, l'ajout d'énolase exogène permet d'augmenter la quantité de C4BP associée à la surface du pneumocoque, et diminue le dépôt de C3b, ce qui renforce la pertinence de cette interaction [371]. D'autres protéines du pneumocoque semblent également impliquées dans l'échappement au système du complément. Ainsi la délétion du gène codant pour la CBP PspA facilite l'élimination du pneumocoque chez la souris car la diminution de la virulence de la souche mutante *pspA* est due à une augmentation de l'opsonisation du pneumocoque par C3b [372, 373]. Il est probable que cet effet de PspA soit lié à l'inhibition de la voie alterne, car les mutants délétés pour *pspA* retrouvent leur virulence dans des souris KO pour les facteurs B ou D [372, 373]. Le mécanisme moléculaire impliqué dans l'inhibition de la voie alterne par PspA n'a cependant pas été identifié pour l'instant, aucune interaction avec un inhibiteur de cette voie n'ayant été mise en évidence. Enfin, un groupe de protéines de surface conservées du pneumocoque, les protéines à triade histidine (Pht), montre également un effet sur le complément. Il s'agit de lipoprotéines présentant dans leur séquence des répétitions du motif HxxHxH (5 répétitions pour PhtA, PhtB et PhtE, 6 pour PhtD) leur permettant de fixer les cations divalents [374], jouant un rôle dans l'homéostasie des métaux tel que le zinc [375]. La délétion des gènes codant pour les protéines Pht chez le pneumocoque augmente le dépôt de C3 sur les bactéries, démontrant le rôle inhibiteur des Pht sur l'activation du complément [376]. En revanche l'absence des protéines Pht n'a pas d'effet sur la fixation du facteur H par le pneumocoque, leur action ne semble donc pas liée, au contraire de PspC, à l'inhibition de la voie alterne par le recrutement du facteur H [376].

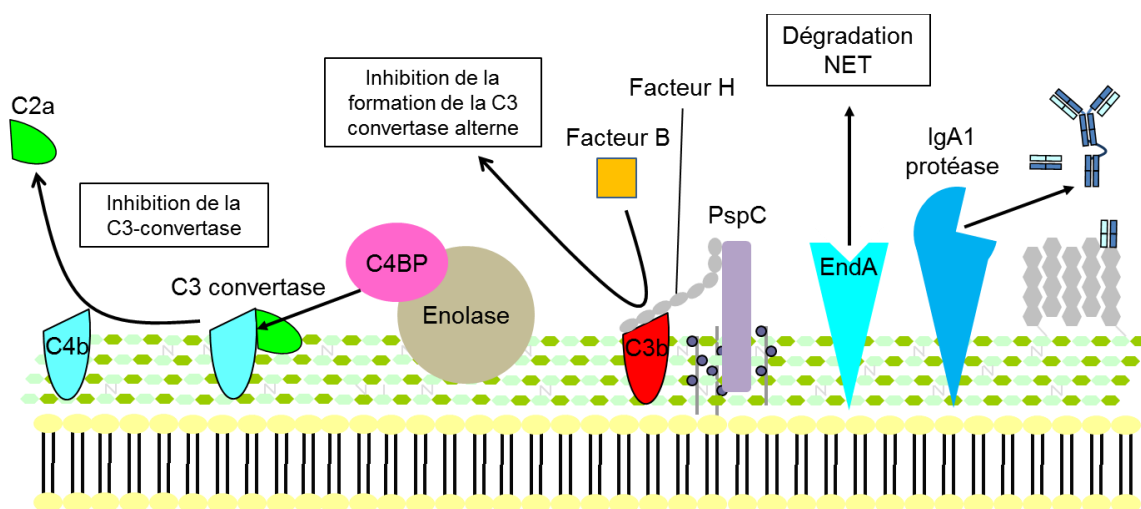


Figure I-21 : Mécanismes d'échappement au système immunitaire du pneumocoque

Exemples de protéines responsables des principaux mécanismes d'échappement au système immunitaire chez le pneumocoque.

En conclusion, bien que la capsule possède un effet important dans la résistance au système immunitaire, le pneumocoque exprime également un ensemble de facteurs de virulence protéiques à sa surface qui complètent sa protection. La plupart de ces protéines ont pour effet de bloquer l'activation du complément, en recrutant et détournant les inhibiteurs solubles de l'hôte (quand les mécanismes d'action sont connus). Cette constatation renforce le fait que le complément est un acteur majeur de la réponse immunitaire au pneumocoque. La variabilité dans la séquence (variants de PspC fixant la C4BP) ou l'expression (Hic n'est codé par le génome que d'un nombre limité de souches) de ces facteurs de virulence pourrait, avec les différences de sérotypes capsulaires, expliquer les variations de sensibilité du pneumocoque au complément.

I-viii- Protéines « moonlighting »

I-viii-1- Définition des protéines « moonlighting »

Les premiers exemples de protéines « moonlighting » ont été décrits à la fin des années 1980, quand Piatigorsky et Wistow [377] ont montré que certaines cristallines, des protéines de structure du cristallin des yeux de vertébrés, étaient des enzymes bien connues. Par exemple, la ϵ -cristalline du canard s'est avérée être la lactate déshydrogénase [378], tandis que la τ -cristalline de tortue est l'enzyme glycolytique énoïase [379]. Un rôle métabolique de ces enzymes dans le cristallin, où elles s'accumulent en grande quantité, est peu probable [380]. Il est plus probable que ces protéines n'aient qu'une fonction structurelle, ce que tend à prouver l'observation que certaines cristallines sont des paralogues enzymatiquement inactifs de ces enzymes [381-383]. Pour décrire le phénomène de « moonlighting », Piatigorsky a initialement utilisé l'appellation de partage de gènes [384]. De nos jours le terme de « moonlighting » est généralement utilisé [385], en référence aux personnes exerçant plusieurs activités. Les protéines « moonlighting » sont des protéines multifonctionnelles particulières, car elles effectuent de multiples fonctions indépendantes, souvent sans rapport entre elles, sans séparer ces fonctions dans des domaines protéiques spécifiques. Selon cette définition, les protéines présentant de multiples fonctions résultant de fusions de gènes sont exclues, de même que les produits de traduction issus de variants d'épissage alternatif d'un même gène. Un autre critère important pour une protéine « moonlighting » est l'indépendance des différentes fonctions, ce qui signifie que l'inactivation de l'une des fonctions (par exemple par mutation) ne devrait pas affecter les autres (tant que la structure n'est pas modifiée). Le « moonlighting » ne doit également pas être confondu avec le pléiotropisme. Les effets pléiotropiques sont généralement le résultat de l'inactivation d'une seule fonction, qui s'avère être impliquée dans des processus cellulaires multiples. Par exemple une protéine ayant des partenaires d'interaction multiples dans différents mécanismes cellulaires, ou une enzyme dont l'activité est importante dans plusieurs voies métaboliques. En conclusion, les protéines « moonlighting » effectuent de multiples fonctions qui diffèrent d'un point de vue mécanistique.

Comme illustré dans le Tableau I-1, des exemples de protéines « moonlighting » ont été décrits chez de nombreux eucaryotes, allant des levures [386] aux mammifères [387] en passant par les plantes [388]. Des protéines « moonlighting » existent aussi chez les procaryotes et seront abordées plus loin dans ce manuscrit. Le fait que la plupart des exemples

de protéines « moonlighting » aient été identifiés chez des levures [386], est très probablement dû à l'intensité des recherches sur ces organismes. Il est encore difficile d'évaluer dans quelle mesure les protéines « moonlighting » sont abondantes. Cependant, l'augmentation rapide du nombre de protéines « moonlighting » identifiées suggère qu'il s'agit d'un phénomène général dans tous les règnes du vivant. On remarque également que les fonctions des protéines « moonlighting » actuellement connues sont extrêmement diversifiées et impliquées dans une grande variété de fonctions biologiques.

| Règne | Protéine | Organisme | Fonction | |
|----------|----------------------|-----------------------------|-----------------------------|---|
| | | | primaire | moonlighting |
| Animalia | Aconitase | <i>H. sapiens</i> | Cycle de Krebs | Homéostasie du fer |
| | ATF2 | <i>H. sapiens</i> | Facteur de transcription | Réponse aux dommages de l'ADN |
| | Cristallines | Variés | Diverses enzymes | Protéines structurales du cristallin |
| | Cytochrome c | Variés | Métabolisme énergétique | Apoptose |
| | DLD | <i>H. sapiens</i> | Métabolisme énergétique | Protéase |
| | ERK2 | <i>H. sapiens</i> | MAP kinase | Répresseur transcriptionnel |
| | ESCRT-II | <i>D. melanogaster</i> | Trafic endosomal | Localisation des ARNm bicoïd |
| | STAT3 | <i>M. musculus</i> | Facteur de transcription | Chaîne respiratoire |
| Plantae | Hexokinase | <i>A. thaliana</i> | Enzyme glycolytique | Signalisation du glucose Contrôle de la mort cellulaire |
| | Preseniline | <i>P. patens</i> | γ -secretase | Cytosquelette |
| Fungi | Aconitase | <i>S. cerevisiae</i> | Cycle de Krebs | Stabilité de l'ADNmt |
| | Aldolase | <i>S. cerevisiae</i> | Enzyme glycolytique | Assemblage de la V-ATPase |
| | Arg5,6 | <i>S. cerevisiae</i> | Biosynthèse de l'arginine | Contrôle transcriptionnel |
| | Enolase | <i>S. cerevisiae</i> | Enzyme glycolytique | Fusion vacuolaire homotypique Import des ARNt mitochondriaux |
| | Galactokinase | <i>K. lactis</i> | Catabolisme du galactose | Facteur de transcription |
| | HaB | <i>S. cerevisiae</i> | Déterminant d'halotolérance | Biosynthèse du coenzyme A |
| | HSP60 | <i>S. cerevisiae</i> | Chaperone mitochondriale | Stabilisation des origines de réplication de l'ADN actives |
| | Phosphofruktokinase | <i>P. pastoris</i> | Enzyme glycolytique | Autophagie |
| | Pyruvate carboxylase | <i>H. polymorpha</i> | Enzyme anapérotyque | Assemblage de l'alcool oxydase |
| Vhs3 | <i>S. cerevisiae</i> | Déterminant d'halotolérance | Biosynthèse du coenzyme A | |
| Protista | Aldolase | <i>P. vivax</i> | Enzyme glycolytique | Invasion des cellules hôte |

Tableau I-1 : Protéines moonlighting chez les eucaryotes

Les mécanismes évolutifs conduisant à l'apparition du « moonlighting » sont actuellement en débat. Il a été proposé par Jeffery que les protéines « moonlighting » aient évolué comme une manière d'étendre les capacités fonctionnelles d'un organisme sans pour autant alourdir son génome [385]. Cette hypothèse est cependant peu probable car chez de nombreux organismes de larges parties du génome semblent n'avoir aucune fonction, ce qui laisse à penser qu'il y a peu de pression sélective limitant la taille du génome [389]. Gancedo [386] a présenté une explication plus plausible se référant à la notion de « bricolage évolutif » [390], qui sous-tend qu'il n'y a pas d'objectif final dans l'évolution et que bien souvent de nouvelles

fonctions se développent par l'adaptation de fonctions existantes. Si une nouvelle fonction résulte en un avantage pour l'organisme, elle sera sélectionnée au cours de l'évolution.

Nombre de protéines « moonlighting » actuellement connues sont des enzymes hautement conservées, également appelées enzymes anciennes ou de ménage. Les enzymes impliquées dans le métabolisme des sucres semblent tout particulièrement adeptes du « moonlighting » [378, 379, 391-394]. Il a ainsi été suggéré que pas moins de 7 des 10 enzymes de la glycolyse et 7 des 8 enzymes impliquées dans le cycle de Krebs sont des protéines « moonlighting » [387, 395]. La question de savoir pourquoi des fonctions « moonlighting » sont si fréquemment identifiées pour des protéines hautement conservées donne libre cours aux spéculations. Ces protéines hautement conservées étant présentes chez de nombreux organismes différents les chances pour qu'une fonction « moonlighting » soit identifiée pour l'une de ces protéines sont plus élevées que pour des protéines présentes dans seulement quelques espèces [385, 396]. Le « moonlighting » semble également plus commun pour des protéines constitutivement exprimées en relativement grandes quantités [397]. Une caractéristique qui pourrait favoriser le développement de fonctions « moonlighting » puisque l'utilisation d'une seule protéine, déjà présente en grande quantité dans la cellule, pour remplir les fonctions de plusieurs autres permettrait d'économiser les acides aminés et l'énergie nécessaires pour synthétiser ces protéines.

En conclusion, il convient de remarquer que l'existence du « moonlighting » constitue un défi majeur pour l'annotation des génomes et pour la biologie systémique. Même des protéines bien étudiées peuvent posséder des fonctions supplémentaires encore à découvrir. On remarque d'ailleurs que jusqu'à maintenant, la découverte de nombreuses protéines « moonlighting » est entièrement due au hasard [377, 391, 398, 399]. L'une des raisons expliquant ce fait est qu'il est difficile de prédire le « moonlighting », de nombreuses fonctions ne dépendant pas, à notre connaissance, de motifs conservés bien identifiés [398, 399]. Ainsi, bien que de nombreuses protéines « moonlighting » soient hautement conservées, il n'est pas possible de prédire la présence de fonctions « moonlighting » par homologie de séquences. Par exemple la levure *Saccharomyces cerevisiae* possède 2 pyruvate carboxylases, qui partagent toutes les 2 environ 80% d'identité de séquence avec la pyruvate carboxylase d'*Hansenula polymorpha*. Malgré le haut degré de similarité entre ces protéines, aucune des pyruvate carboxylases de *S. cerevisiae* n'est capable d'accomplir la fonction « moonlighting » de celle d'*H. polymorpha* dans l'assemblage et la translocation de l'alcool oxydase péroxisomale [400]. Au contraire, la pyruvate carboxylase de *Pichia pastoris* partage

également environ 80% d'identité de séquence avec celle d'*H. polymorpha*, et est capable de remplir la même fonction « moonlighting » [398, 401]. De plus, il n'est pas rare qu'une même protéine ait différentes fonctions « moonlighting » dans différentes espèces [400, 402].

I-viii-2- Les protéines « moonlighting » chez les procaryotes

I-viii-2-a- Diversité des protéines et fonctions « moonlighting » chez les procaryotes

Plus de 20 ans après l'introduction du concept de « moonlighting », il apparaît clairement que les bactéries sont parmi les principaux bénéficiaires de ce mécanisme évolutif. Il y a maintenant un nombre significatif d'exemples de protéines « moonlighting » bactériennes. Nombre de ces protéines jouent un rôle dans les propriétés de virulence des bactéries, ce qui rend la reconnaissance de ce phénomène importante en bactériologie. Il s'agit principalement d'enzymes de la glycolyse ou d'autres voies métaboliques ainsi que des chaperones, comme illustré dans le Tableau I-2.

| Organisme | Protéine | Fonction moonlighting |
|------------------------|--------------------|---|
| <i>S. pyogenes</i> | GAPDH | Liaison plasminogène/plasmine, fibronectine, lysozyme, myosine, actine, C5a, uPAR/CD87 |
| | Enolase | Liaison au plasminogène |
| <i>S. agalactiae</i> | GAPDH | Liaison au plasminogène |
| | PGK | Liaison à l'actine |
| <i>S. mutans</i> | Enolase | Liaison plasminogène, actine, fibrinogène Modulation de l'activité des lymphocytes B |
| <i>S. aureus</i> | Enolase | Liaison à la laminine |
| <i>M. pneumoniae</i> | EF-Tu, PdhB | Liaison à la fibronectine |
| | GAPDH | Liaison à la mucine |
| <i>M. tuberculosis</i> | Malate synthase | Liaison à la laminine |
| | SodA | Liaison aux cellules épithéliales |
| | DnaK | Liaison au plasminogène |
| <i>B. anthracis</i> | GAPDH, Enolase | Liaison au plasminogène |
| <i>E. coli</i> | GAPDH | Liaison au plasminogène |
| <i>L. jensenii</i> | Enolase | Inhibe la fixation des <i>Neisseria</i> |
| <i>L. johnsonii</i> | EF-Tu | Liaison aux cellules intestinales et à la mucine Induction de l'inflammation |
| | GroEL | Liaison aux cellules intestinales et à la mucine Immunomodulation |
| <i>L. fermentum</i> | Tig | Empêche l'adhésion de <i>E. faecalis</i> |
| <i>L. plantarum</i> | GAPDH | Liaison mucine et fibronectine Adhésion aux cellules Caco-2 |
| | Enolase | Liaison à la fibronectine |
| | EF-Tu, TPI | Adhésion aux cellules Caco-2 |
| <i>L. crispatus</i> | GAPDH, Enolase | Liaison au plasminogène |
| | ET-Tu | Adhésion aux cellules |
| | Glutamate synthase | Liaison plasminogène, collagène I, laminine, fibronectine |

Tableau I-2 : Protéines « moonlighting » chez les procaryotes

La glycolyse existe dans les 3 règnes du vivant, et il est supposé qu'elle soit apparue tôt dans l'évolution du vivant. C'est la principale voie métabolique d'assimilation du glucose et permet la production d'énergie. La glycolyse se déroule dans le cytoplasme de la cellule et repose sur l'activité de 10 enzymes (Figure I-22), commençant par l'hexokinase qui catalyse la conversion du glucose en glucose-6-phosphate, et se terminant par la pyruvate kinase qui catalyse la conversion du phosphoénolpyruvate en pyruvate [403].

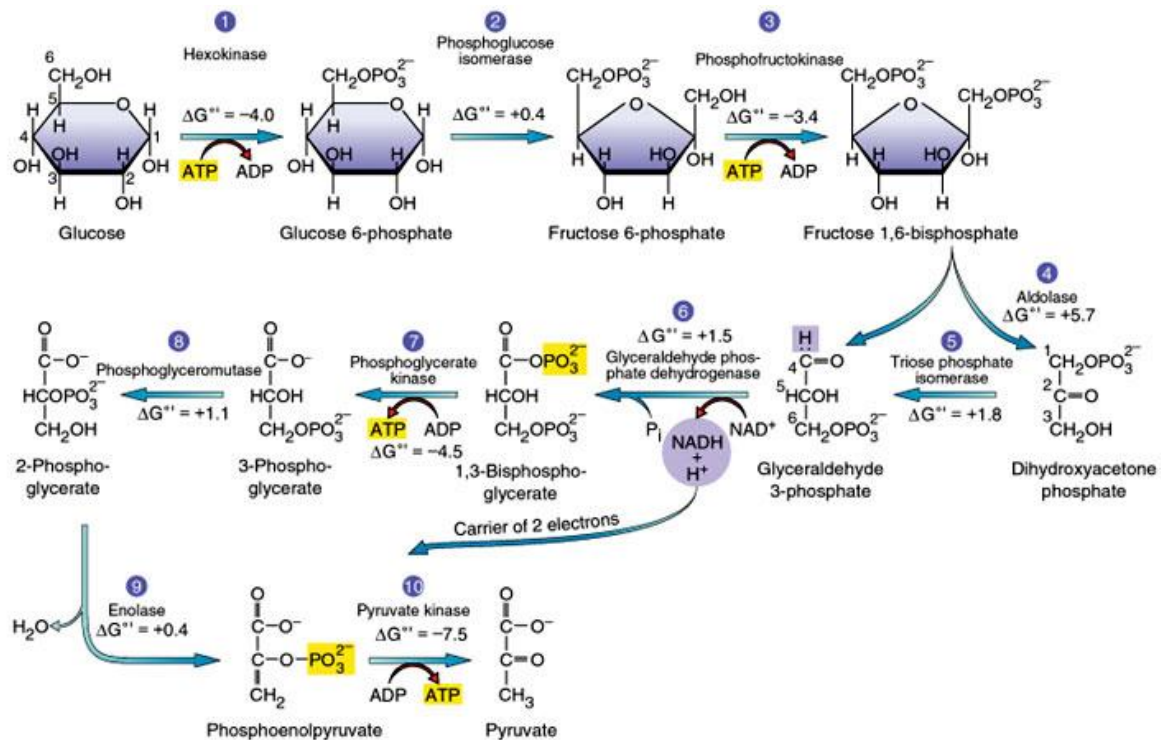


Figure I-22 : représentation schématique de la glycolyse [403]

L'un des meilleurs exemples de « moonlighting » bactérien est le cas de l'énolase, avant dernière enzyme de la glycolyse catalysant la conversion du 2-phosphoglycérate en phosphoénolpyruvate. On rapporte pour un nombre sans cesse croissant de bactéries, Gram-positif et Gram-négatif, la présence d'énolase en surface ayant des fonctions « moonlighting ». Beaucoup d'attention a été apportée à l'énolase de *S. pyogenes*, en particulier grâce aux travaux de Pancholi et Fischetti qui sont responsables pour une bonne part de notre compréhension du rôle de l'énolase dans la virulence des streptocoques de groupe A. À l'origine, c'est l'analyse des propriétés de liaison du plasminogène à des protéines de la paroi de *S. pyogenes* qui a permis d'identifier l'énolase comme étant le ligand présentant la plus forte affinité. Cette émolase de surface est enzymatiquement active et des anticorps dirigés contre elle induisent l'opsonisation et augmentent la phagocytose de *S.*

pyogenes [404]. Il s'avère que l'énolase est présente en surface de la plupart des streptocoques [405], incluant le pneumocoque [357]. Comme expliqué précédemment, le plasminogène se lie à la surface du pneumocoque et permet aux bactéries de traverser la matrice extracellulaire, ce qui le rend important pour l'invasion des tissus humains [360]. Il a également été montré que l'énolase recombinante soluble peut se lier à la surface du pneumocoque, même quand elle est associée au plasminogène [357]. L'énolase de mammifères est également capable de lier le plasminogène, cette interaction est dépendante de résidus lysine C-terminaux de ces émolases qui se lient aux sites de liaison des lysines du plasminogène [406]. Pour tester si l'énolase du pneumocoque lie également le plasminogène par des lysines C-terminales, les lysines 433 et 434 ont été mutées ou clivées par traitements à la carboxypeptidase, ont été réalisés. Ces expériences ont montré une inhibition de la liaison du plasminogène à l'énolase [357], mais les mesures d'interaction étaient réalisées en conditions dénaturantes par Far-Western blot après SDS-PAGE de la GAPDH [357]. Des analyses complémentaires, réalisées en conditions natives, ont révélé qu'un peptide interne de l'énolase du pneumocoque, comprenant les résidus 248 à 256, est en partie responsable de l'interaction avec le plasminogène [407]. Ce type de travail a également été réalisé sur l'énolase de *S. pyogenes*, où la liaison de l'énolase native ou de mutants au plasminogène a été étudiée [352]. La délétion ou la substitution des résidus lysine C-terminaux dans l'énolase de *S. pyogenes* provoque ainsi une diminution significative de la liaison au plasminogène. De plus des bactéries codant l'énolase mutée montrent une réduction drastique de leur capacité à acquérir du plasminogène depuis le plasma humain et à traverser la matrice extracellulaire [352]. Une étude plus récente a montré que des lysines internes contribuent à la liaison au plasminogène [408]. Enfin, un site de liaison similaire a été identifié dans les émolases des *Bifidobacter* [409]. L'exemple de l'énolase illustre une situation exceptionnelle pour les protéines « moonlighting », où des sites conservés sont impliqués dans une fonction « moonlighting » chez différentes espèces. Cependant l'énolase n'est pas uniquement capable de lier le plasminogène, d'autres interactions ou fonctions ont également été mises en évidence. Ainsi, il a été montré que l'énolase de *Streptococcus gordonii* fixe la mucine salivaire Muc7 [410] et celle de *Streptococcus mutans* la mucine MG2 [411]. L'énolase de *S. aureus* reconnaît quant à elle la laminine [412] et celle de *Lactobacillus plantarum* la fibronectine [413]. Plus récemment il a été montré que l'énolase de *S. pneumoniae* recrute C4BP et participe à la protection de la bactérie face au complément [371]. D'autres travaux ont mis en évidence que l'énolase de surface de *Lactobacillus jensenii* est un puissant inhibiteur de l'adhérence de *Neisseria gonorrhoeae* aux cellules épithéliales [414]. Enfin, des

effets sur l'immunité ont également été décrits, l'énolase de *Streptococcus sobrinus* est ainsi une protéine immunosuppressive [415] tandis que celle de *Paenibacillus larvae*, l'agent causatif de la loque américaine chez les abeilles, est hautement inflammatoire [416].

L'étude de l'exemple de l'énolase montre que, même pour une protéine « moonlighting » pourtant conservée, des fonctions diverses peuvent co-exister. Si certaines fonctions « moonlighting » semblent parfois récurrentes (recrutement du plasminogène), une variété d'autres fonctions peuvent également être découvertes suivant les organismes étudiés.

Au-delà de la capacité des protéines « moonlighting » à accomplir différentes fonctions, on remarque que les activités additionnelles de ces protéines peuvent ne survenir que quand elles se trouvent à une localisation différente de celle qu'elles occupent pour accomplir leurs fonctions classiques. Concernant les enzymes glycolytiques bactériennes, les fonctions « moonlighting » identifiées jusqu'à maintenant sont toujours liées à une localisation à la surface de la bactérie. Ainsi, en plus du « moonlighting biochimique », il est possible de définir un « moonlighting géographique », et les deux aspects peuvent être requis pour permettre à une protéine d'exercer sa véritable fonction « moonlighting ». Cela ne signifie pas pour autant que ces enzymes de la glycolyse n'ont pas d'activité « moonlighting » intracellulaire, mais peu d'activités de ce type ont pour l'instant été démontrées. L'un des exemples de « moonlighting » intracellulaire et celui de la glutamate racémase Murl de *Mycobacterium tuberculosis*, qui peut agir comme un inhibiteur de l'ADN gyrase en empêchant sa liaison à l'ADN [417]. Il a également récemment été suggéré par une analyse en double hybride que plusieurs enzymes glycolytiques de *Bacillus subtilis* pourraient être impliquées dans le traitement des ARN [418].

I-viii-2-b- Sécrétion des protéines « moonlighting » chez les procaryotes

La sécrétion de protéines à travers les membranes biologiques est dans la plupart des cas due à des machineries de translocation reconnaissant une séquence spécifique située à l'extrémité N-terminale de la protéine devant être sécrétée, appelée peptide signal. Chez les bactéries le système de sécrétion classique Sec, dépendant de l'ATPase SecA, est responsable de la plus grande partie de l'export de protéines. D'autres voies de sécrétion ont également été découvertes. Certaines bactéries expriment ainsi un système de sécrétion très semblable à la voie Sec reposant sur la protéine SecA2, qui ne semble exporter qu'un nombre limité de substrats impliqués dans la virulence [419]. Le système de sécrétion TAT (pour Twin-Arginine Translocation), qui reconnaît un motif consensus comportant 2 arginines est

également une voie d'export importante qui permet, au contraire du système Sec, de transporter des protéines entièrement repliées [420]. Cependant il apparaît que dans certains cas, comme pour les protéines « moonlighting », des protéines ne présentant pas de peptide signal sont retrouvées dans l'espace périplasmique (des bactéries Gram-négatif), le surnageant de culture (Gram-positif et Gram-négatif) ou associées à la surface de bactéries. Il semble donc possible pour les bactéries de sécréter ou relarguer des protéines de manière non conventionnelle. L'un des exemples les mieux documentés d'export de protéine « moonlighting » est celui des superoxyde dismutases (SOD). Ces enzymes participent à la protection des cellules contre les espèces réactives de l'oxygène, en catalysant la dismutation des ions superoxyde en oxygène et peroxyde d'hydrogène, mais peuvent également servir d'adhésines en surface de certains pathogènes [421]. Ainsi, il a été montré que la SOD de *M. tuberculosis* est sécrétée mais ne contient aucun peptide signal [422]. Parce que la délétion du gène *secA2* abolit la virulence de *M. tuberculosis* chez la souris, la présence en surface de certaines protéines impliquées dans la virulence a été étudiée en comparant le mutant de délétion *secA2* et la souche sauvage. Ce travail a montré que l'export de la SOD chez *M. tuberculosis* est dépendant de la voie de sécrétion accessoire SecA2 [423]. La sécrétion de SOD dépendante de SecA2 a également été mise en évidence chez un autre pathogène, la bactérie Gram-positif *L. monocytogenes* [424]. Lors de cette étude qui repose également sur l'utilisation d'un mutant de délétion *secA2*, il a été mis en évidence que 10 protéines sans peptide signal étaient sécrétées par la voie SecA2, dont la SOD. Ces résultats montrent également que 7 protéines présentant un peptide signal sont dépendantes de SecA2 pour leur export, ce qui confirme le fait que la voie SecA2 est capable de réaliser à la fois une sécrétion dépendante du peptide signal et une sécrétion non conventionnelle, sans passer par la reconnaissance du peptide signal.

De façon générale, les mécanismes permettant l'export des protéines « moonlighting » restent à ce jour très mal compris, leur prise en charge par des systèmes de sécrétion est rarement prouvée. Des hypothèses régulièrement évoquées n'impliquant pas les systèmes de sécrétion sont celles d'un relargage de protéines cytoplasmiques par des fuites (occasionnées par exemple durant la division, l'intégrité de la membrane pouvant être momentanément perturbée lors de la fission) ou par la lyse de cellules au sein d'une même population.

I-viii-3- La GAPDH comme modèle de protéine « moonlighting »

I-viii-3-a- Fonctions « moonlighting » des GAPDH bactériennes

Certaines des premières preuves de l'existence de fonctions « moonlighting », avant même que ce terme ne soit introduit, viennent de l'étude de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) de *S. pyogenes*. La GAPDH est l'une des enzymes clé de la glycolyse, elle catalyse la phosphorylation oxydative du glycéraldéhyde-3-phosphate en 1,3-bisphosphoglycérate. Cette réaction a lieu en présence de phosphate inorganique pour la phosphorylation, qui est couplée à la réduction du NAD^+ en NADH,H^+ , ce qui en fait la première étape de la glycolyse générant de l'énergie pour la cellule. La GAPDH est un homotétramère dont les sous-unités ont une masse moléculaire variant de 34 à 38 kDa selon les espèces. Une sous-unité est composée d'environ 330 acides aminés qui se replie en formant deux domaines. Le premier domaine est impliqué dans la fixation du cofacteur (NAD^+), chacune des sous-unités fixe donc une molécule de NAD^+ . Le second domaine est impliqué dans la fixation du substrat et dans la catalyse, ce domaine contient une cystéine et une histidine essentielles au mécanisme catalytique.

Pancholi et Fischetti furent les premiers à rapporter qu'une protéine, adhérant à la surface de la souche M6 de *S. pyogenes* en quantité importante, présente l'activité enzymatique d'une GAPDH ainsi qu'une homologie de séquence à d'autres GAPDH. Il a été montré que cette GAPDH de surface appelée SDH (pour surface dehydrogenase) se lie au lysozyme, à des protéines du cytosquelette et à la fibronectine [353]. Un autre groupe a identifié la GAPDH de *S. pyogenes* comme un récepteur de surface pour le plasminogène [425, 426]. D'autres travaux ont mis en évidence que la GAPDH de *S. pyogenes* induit une activité de signalisation chez les cellules de l'hôte. Ainsi l'incubation de cellules nasopharyngéales humaines (Detroit 562) avec des bactéries intactes ou avec la GAPDH purifiée provoque un ensemble de réactions de phosphorylation dans les cellules humaines. L'utilisation d'inhibiteurs des tyrosines et serines kinases inhibe l'invasion des cellules par *S. pyogenes*, ce qui semble confirmer que la modification du phosphoprotéome induite par la GAPDH est un signal important pour l'invasion [427]. L'étude de la liaison de GAPDH de *S. pyogenes* marquée à l'iode 125 sur des protéines isolées de membranes de cellules Detroit 562 a mis en évidence des interactions avec des protéines 14-3-3 ϵ , importantes dans la signalisation chez les cellules eucaryotes, qui pourrait expliquer son effet sur le phosphoprotéome [427]. Une interaction avec le récepteur CD87/uPAR (urokinase plasminogen activator receptor), qui participe à

l'adhésion de *S. pyogenes* aux cellules a également été mise en évidence [428]. Enfin, la GAPDH de surface de *S. pyogenes* inhibe l'action de C5a en liant ce fragment de C5, ce qui permet d'inhiber son effet chimiotactique sur les neutrophiles [429].

D'autres streptocoques utilisent la GAPDH pour des fonctions « moonlighting » variées. Chez *S. agalactiae* la GAPDH agit comme un facteur de virulence en modulant l'activité des lymphocytes B et sa surexpression augmente la colonisation hépatique de souris résistantes aux infections à streptocoques du groupe B [430]. La GAPDH de *S. oralis* reconnaît quant à elle la protéine majeure des fimbriae de *Porphyrromonas gingivalis*, facilitant la colonisation de la cavité buccale par ce dernier [431]. Chez *S. suis*, la GAPDH est capable de lier l'albumine [432] et permet aussi l'adhésion aux cellules de l'hôte [433]. La GAPDH a également des propriétés adhésives dans d'autres bactéries Gram-positif. Ainsi la GAPDH de surface codée par le gène *gapB* chez *S. aureus* interagit avec le plasminogène et la transferrine [434], tandis que la GAPDH de surface de *L. plantarum* fixe la mucine gastrique et les cellules Caco-2, une lignée de cellules épithéliales intestinales [435, 436]. Chez *Mycoplasma genitalium*, la GAPDH de surface est impliquée dans la liaison de la bactérie à la mucine [437]. Les fonctions « moonlighting » de la GAPDH de surface ne sont cependant pas restreintes aux bactéries à Gram-positif, il a été montré que des souches de *E. coli* enterohémorragiques et entéropathogéniques (EHEC et EPEC) expriment une GAPDH de surface qui recrute le plasminogène et le fibrinogène [438].

I-viii-3-b- Export et association à la surface de la GAPDH chez les bactéries

À l'instar des autres protéines « moonlighting » nos connaissances sont actuellement très limitées concernant les mécanismes par lesquels la GAPDH transite depuis le cytoplasme vers le milieu extracellulaire ou la surface bactérienne.

Parmi les quelques informations disponibles, la sécrétion active de GAPDH a récemment été montrée chez les EPEC [439]. Ce travail a mis en évidence que chez ces espèces, la délétion du gène *escN* codant pour l'ATPase du système de sécrétion de type III (T3SS) abolie la sécrétion de GAPDH. Ces données indiquent que la GAPDH serait activement sécrétée par le biais du T3SS, ces résultats sont néanmoins à nuancer par le fait que cet effet n'est visible que dans certaines conditions de culture. Ainsi, le fait que la GAPDH soit retrouvée dans le surnageant de culture de la souche sauvage et du mutant quand les bactéries sont cultivées en LB laisse à penser qu'un autre mécanisme permet l'export de la GAPDH [438].

Les autres travaux réalisés à ce jour sur la question de l'export de la GAPDH chez les bactéries portent sur *S. agalactiae* et *S. aureus*. Chez *S. aureus* une analyse protéomique a montré que la délétion de l'autolysine majeur Atl a un profond impact sur le sécrétome [440]. En particulier 22 protéines typiquement cytoplasmiques (enzymes de la glycolyse, du cycle de Krebs, facteurs d'élongation...) dont la GAPDH, excrétées par la souche sauvage, ne sont plus retrouvées dans le sécrétome de la souche mutante Δatl . À l'inverse, un mutant de délétion de *tagO*, qui présente une activité autolytique plus importante, libère plus de GAPDH. Ces résultats montrent que chez *S. aureus*, l'export de la GAPDH est dû au relargage de protéines cytoplasmiques suite à la lyse de bactéries. Il semble qu'une certaine sélection des protéines libérées par ce mécanisme ait lieu, puisque celles-ci ne sont pas forcément les protéines les plus abondantes du cytoplasme. Le travail réalisé chez *S. agalactiae* a également montré qu'un taux de lyse réduit dans la population bactérienne est corrélé à une diminution de la quantité de GAPDH dans le milieu extracellulaire et associée à la surface, alors que l'induction de la lyse (détergents, antibiotiques, surexpression d'une autolysine) conduit à une augmentation du taux de GAPDH extracellulaire [441]. Ces résultats accèdent donc la thèse selon laquelle l'export de protéines « moonlighting » cytoplasmiques, dépourvues de peptide signal, peut être dû à la lyse de bactéries dans la population.

Au-delà de la manière dont la GAPDH quitte le cytoplasme pour atteindre la surface bactérienne, de nombreuses questions se posent également quant à savoir comment elle s'associe à la surface. En effet, il a été montré que la GAPDH de *S. agalactiae* est en mesure de se fixer à la surface de différentes bactéries (*E. coli*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *L. lactis*) [441], ce qui suggère un mode d'attachement reposant sur la reconnaissance d'un substrat commun. Chez *S. pyogenes* l'interaction de la GAPDH avec la protéine M reste contestée [353, 442]. Enfin chez *Lactobacillus crispatus* il semble que la GAPDH soit capable, à pH acide, de lier les acides lipotéichoïques [443]. Globalement, le ou les modes d'attachement de la GAPDH en surface des bactéries n'est pas clairement établi. Il semble que les GAPDH de certains organismes soient ainsi capables de se fixer en surface de différentes bactéries, peut-être en interagissant avec des composants de la paroi. La présence d'interactions avec des protéines de surface ne peut cependant pas être exclue. Il est envisageable que les mécanismes de recrutement à la surface diffèrent suivant les espèces bactériennes, et des études plus approfondies sur ce sujet sont clairement nécessaires.

I-viii-3-c- La GAPDH du pneumocoque

Localisation en surface

Chez le pneumocoque, la GAPDH en tant que protéine moonlighting a été très peu étudiée. Les premières preuves que la GAPDH est présente à la surface du pneumocoque ont été apportées en 2004, par une équipe cherchant à mettre en évidence des antigènes protéiques présents en surface du pneumocoque entraînant une réponse immunitaire [444]. L'objectif était de caractériser des protéines de surface pouvant être utilisées comme candidats vaccin, afin de surmonter les problèmes de remplacement sérotypiques posés par les vaccins polysaccharidiques et conjugués. Pour réaliser ce travail, les protéines associées à la surface du pneumocoque ont été extraites, séparées par électrophorèse 2D et transférées sur membrane de nitrocellulose. Des sera d'enfants ayant été porteurs de différentes souches de pneumocoques (6A, 6B, 11, 12, 14, 15, 19A, 19F, 23A, 23F) ont été utilisés afin d'identifier les protéines de surface du pneumocoque ayant induit une réponse anticorps chez ces enfants. Les protéines reconnues par les anticorps présents dans ces sera ont été identifiées par spectrométrie de masse. Cette expérience a révélé que plusieurs enzymes de la glycolyse, dont la GAPDH, sont présentes à la surface du pneumocoque et entraînent la production d'anticorps chez l'être humain. Cette première constatation de la présence de GAPDH en surface du pneumocoque est confirmée la même année par une autre équipe. Le travail réalisé par Simone Bergmann montre en effet, en combinant une analyse par Western blot d'un fractionnement partiel et une immuno-localisation par microscopie électronique, que la GAPDH est présente à la surface de la bactérie [358].

Comme présenté précédemment différentes voies de sécrétion peuvent transporter des protéines depuis le cytoplasme vers l'espace extracellulaire. Concernant les systèmes Sec et TAT, aucune preuve de transport de protéines ne présentant pas de peptide signal n'a à ce jour été apporté. La GAPDH du pneumocoque ne présentant pas de peptide signal pour la voie Sec, son implication dans l'export de la GAPDH semble donc exclue. Le système de sécrétion TAT est quant à lui absent chez *S. pneumoniae*, ce qui exclut la possibilité que l'export de protéines moonlighting se fasse par ce biais chez le pneumocoque. Le système SecA2 est capable de prendre en charge des protéines ne présentant pas de peptide signal chez *M. tuberculosis* et *L. monocytogenes*, néanmoins chez le pneumocoque ce système n'est pas exprimé par toutes les souches. La présence de GAPDH a été montrée en surface de souches de pneumocoques qui ne codent pas de système SecA2, comme la souche R6, ce qui laisse

supposer que ce système n'est pas impliqué dans l'export de la GAPDH chez *S. pneumoniae*. En revanche le pneumocoque est bien connu pour ses capacités de fratricide (pneumocines et compétence décrits en I-ii-1- et I-ii-2-), qui conduisent à la lyse d'une partie des cellules de la population. L'implication de ce phénomène dans la libération de protéines non sécrétées a déjà été proposée pour la pneumolysine et il a été montré que la GAPDH est libérée par lyse chez *S. agalactiae* et *S. aureus*.

Les travaux de Bergmann ayant montré que la GAPDH du pneumocoque est présente en surface de souche capsulées et non-capsulées, il est à exclure que la GAPDH puisse se fixer à la capsule [358]. Des interactions avec des protéines de surface sont possibles, mais les résultats obtenus avec la GAPDH de *S. agalactiae*, très proche de celle du pneumocoque (92% d'identité de séquence et 96% de similarité de séquence), laissent à penser que certaines GAPDH peuvent interagir avec des structures de surface relativement conservées. Il a en été récemment montré par des tests d'interaction en phase solide qu'une forme recombinante de la GAPDH de *S. agalactiae* est capable de se fixer de manière dose-dépendante en surface de la bactérie, vivante ou tuée par la chaleur, et que cette interaction est inhibée par des anticorps anti-GAPDH [441]. De plus une analyse par Western blot anti-GAPDH montre la fixation en solution de cette GAPDH recombinante sur différentes souches de *S. agalactiae*, ainsi que sur plusieurs autres espèces bactériennes (*E. coli*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *L. lactis*) [441]. Ces résultats indiquent donc que la GAPDH de *S. agalactiae* est capable d'interagir avec une structure de surface bactérienne relativement conservée puisque présente chez différentes espèces et qui n'est pas détruite par un traitement thermique. La démonstration que la GAPDH de *L. crispatus* interagit avec les acides lipotéichoïques de la bactérie désigne la paroi comme candidat pour la fixation de la GAPDH en surface [443].

Fonctions « moonlighting »

La seule fonction moonlighting décrite jusqu'à présent pour la GAPDH du pneumocoque l'a été dans les travaux de Bergmann de 2004. Cette étude a en effet mis en évidence, grâce à des expériences de Far-western blot, une fixation dose-dépendante de la GAPDH du pneumocoque au plasminogène [358]. Les auteurs ont confirmé ces résultats en réalisant des expériences de résonance plasmonique de surface, durant lesquels ils ont mesuré la fixation de concentrations croissantes de plasminogène ou de plasmine sur la GAPDH immobilisée. Les constantes de dissociations calculées à partir de ces résultats montrent que la GAPDH du

pneumocoque présente une affinité dix fois plus élevée pour la plasmine que pour le plasminogène [358].

Comme présenté précédemment (I-vii-3-a) le recrutement de la plasmine en surface du pneumocoque est un phénomène qui favorise l'adhésion et l'invasion des tissus de l'hôte. Il apparaît comme probable que la GAPDH, du fait de sa capacité de liaison au plasminogène et à la plasmine, soit l'un des récepteurs de surface impliqué dans ce mécanisme de virulence.

I-ix- Présentation des travaux

I-ix-1- Interaction GAPDH-C1q

La possibilité que la GAPDH puisse avoir d'autres fonctions que celle de recrutement du plasminogène, ne peut être exclue. En effet, la propension des GAPDH à établir des interactions avec diverses protéines a été précédemment illustrée. Des résultats préliminaires obtenus dans l'équipe de notre collaborateur Philippe Frachet, à l'IBS, ont identifié la GAPDH humaine comme un potentiel ligand de C1q à la surface des cellules apoptotiques. Les séquences des GAPDH du pneumocoque et humaine sont identiques à environ 50%, et similaires à plus de 60% (Figure I-23), la GAPDH du pneumocoque est ainsi plus proche de l'humaine que de celle de *E. coli* (25% d'identité de séquence, 39% de similarité de séquence). L'homologie de séquence entre la GAPDH humaine et celle du pneumocoque, qui sont toutes deux présentes à la surface cellulaire, nous a conduits à considérer le fait que la GAPDH du pneumocoque puisse être un ligand de C1q.

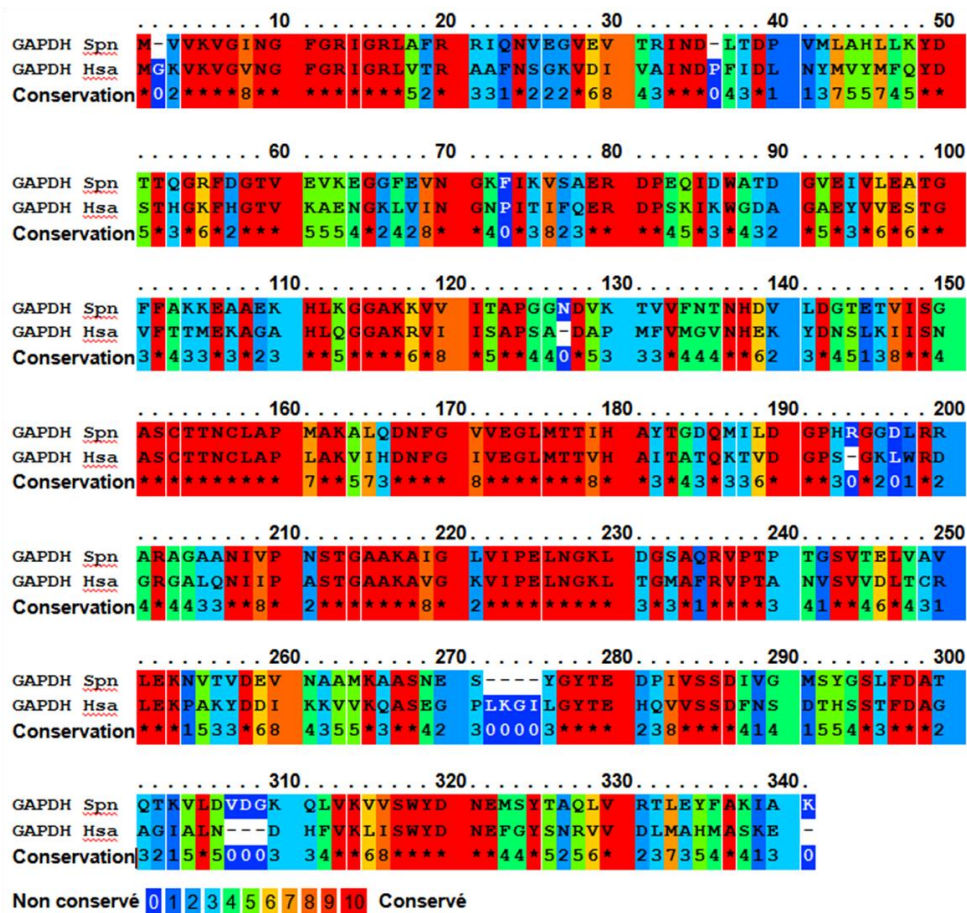


Figure I-23 : Alignement des séquences protéiques des GAPDH Hsa et Spn

Le degré de conservation des résidus est indiqué par le code couleur, GAPDH Hsa : GAPDH humaine, GAPDH Spn : GAPDH du pneumocoque.

En préalable au travail présenté ici, nous avons réalisé un crible d'interactions par ELISA, basé sur le travail de Cécile Frolet [276], entre la GAPDH du pneumocoque recombinante et diverses protéines humaines (Figure I-24). Ce crible a montré que la GAPDH du pneumocoque ne présente pas d'interactions avec des protéines de la matrice extracellulaire, mais qu'elle semble en revanche être reconnue par des protéines du système immunitaire inné, dont C1q.

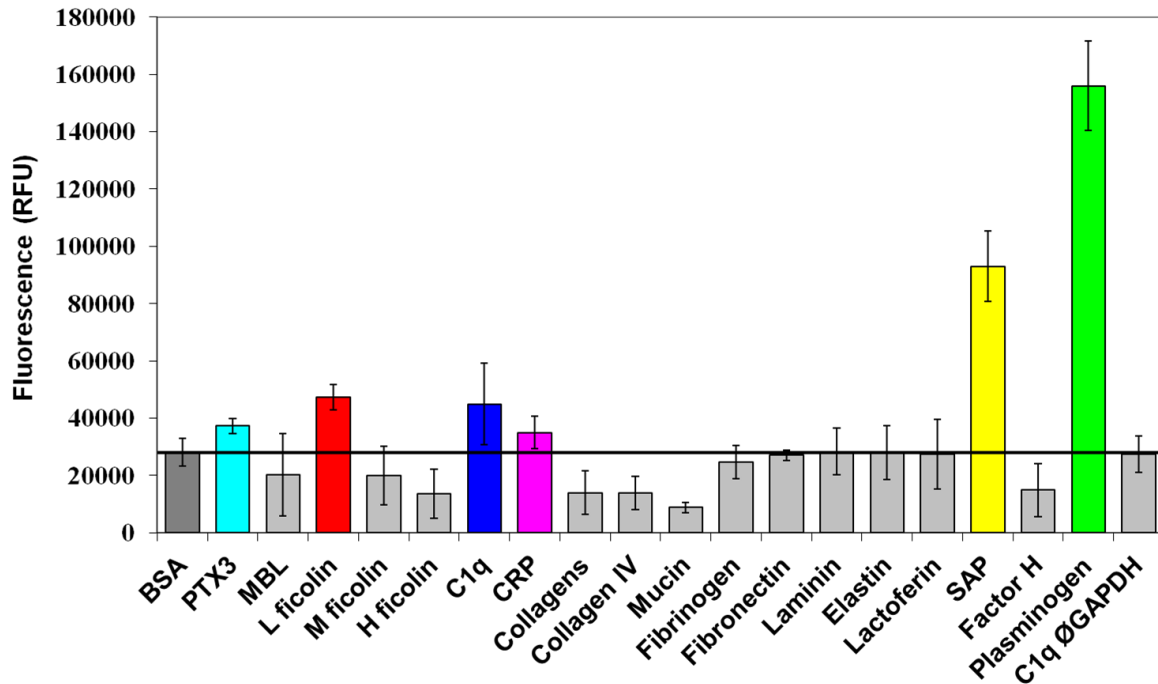


Figure I-24 : Crible d'interactions entre la GAPDH du pneumocoque et diverses protéines humaines

Les différentes protéines humaines ou la BSA ont été immobilisés en triplicatas en plaque 96 puits (1 µg/puits). La fixation de la GAPDH du pneumocoque (1 µg) a été mesurée en utilisant un anticorps anti-GAPDH Spn. Les valeurs de luminescence brutes, sont présentées (exprimées en Unité Arbitraire) Une expérience représentative est présentée, les données montrées représentent la valeur moyenne ± E.S. des triplicatas.

Durant ce travail nous avons donc cherché à confirmer et à caractériser les interactions entre les GAPDH (humaine et du pneumocoque) et C1q. Pour cela, nous avons produit de manière recombinante et purifié les GAPDH. Ces protéines recombinantes nous ont permis de mettre en évidence les interactions GAPDH-C1q par des tests d'interaction en phase solide et par une approche de pontage chimique en solution. Les interactions entre les GAPDH recombinantes et C1q ont par la suite été caractérisées par des expériences de résonance plasmonique de surface, qui ont montré des interactions de forte affinité entre les GAPDH et C1q, médiées par les têtes globulaires de C1q. Nous avons également construit des mutants chez les souches R6 et D39 du pneumocoque dont l'expression de GAPDH en surface est

diminuée. L'utilisation de ces mutants pour des tests d'interaction en phase solide a permis de mettre en évidence que la GAPDH localisée en surface du pneumocoque est impliquée dans la reconnaissance de la bactérie par C1q.

I-ix-2- Activation du complément via l'interaction GAPDH-C1q

La possibilité d'une reconnaissance de ces deux GAPDH par C1q conduit à une autre interrogation, à savoir quelles sont les conséquences de cette reconnaissance des GAPDH par C1q ? En effet, comme évoqué précédemment, les cellules apoptotiques doivent être reconnues comme étant du soi-altéré, leur prise en charge par le système immunitaire devant induire une réponse anti-inflammatoire et tolérogène. Au contraire, la reconnaissance d'un pathogène comme le pneumocoque par le système immunitaire entraîne une réponse inflammatoire qui est nécessaire à son élimination. La GAPDH humaine étant un ligand potentiel de C1q sur les cellules apoptotiques, il est envisageable que cette reconnaissance conduise à une réponse anti-inflammatoire. Dans ce cas, il est légitime de s'interroger sur les conséquences de la reconnaissance de la GAPDH du pneumocoque par C1q. En d'autres termes, est-il possible que la GAPDH présente en surface du pneumocoque soit un moyen utilisé par la bactérie pour se faire passer pour une cellule du soi-altéré, par mimétisme moléculaire ? Auquel cas la GAPDH du pneumocoque aurait une autre fonction moonlighting, elle permettrait de moduler la réponse immunitaire de l'hôte en limitant l'inflammation, facilitant l'échappement au système immunitaire. On a vu que chez *S. agalactiae* la GAPDH a une action immunomodulatrice, et sa surexpression par la bactérie provoque une augmentation de la production d'IL-10 (une puissante cytokine anti-inflammatoire) chez la souris, en lien avec une virulence accrue [430]. La GAPDH de *S. agalactiae* semble donc capable d'induire une réponse anti-inflammatoire, ce qui renforce l'intérêt de l'étude des conséquences des interactions entre les GAPDH humaine et du pneumocoque et C1q.

Nous avons dans un premier temps évalué par un test biochimique la capacité des GAPDH recombinantes à activer le complexe C1, et montré que seule la GAPDH du pneumocoque provoque le clivage protéolytique de C1s, signe de l'activation du complexe. Nous avons confirmé ces résultats par des tests de dépôt de C1q, C4b et C3b sur les GAPDH recombinantes à partir de sérum, qui ont montré que seule la GAPDH du pneumocoque provoque l'activation du complément et induit le dépôt de C4b et C3b. L'utilisation des pneumocoques de souches sauvages et mutantes dans les tests de dépôt du complément a

permis de confirmer que la reconnaissance de la GAPDH de surface du pneumocoque par C1q participe à l'activation du complément et provoque le dépôt de C4b et C3b en surface des bactéries. Nous avons également tenté de développer un test de phagocytose du pneumocoque pour étudier l'effet de la réduction de l'expression en surface de la GAPDH chez les mutants sur l'opsonisation par C3b.

I-ix-3- Effet conjugué de la liaison de C1q et du plasminogène sur la GAPDH

La GAPDH du pneumocoque étant capable de fixer le plasminogène et la plasmine, nous avons cherché à évaluer l'effet de ce recrutement d'une protéase de l'hôte sur l'activation du complément induite lors de la reconnaissance de la GAPDH par C1q. Les résultats obtenus lors de tests de dépôt de C1q, C4b et C3b en présence de plasminogène ou de plasmine montrent que le recrutement de cette protéase n'inhibe pas l'interaction avec C1q et peut même augmenter la fixation de C1q à la GAPDH. Nous avons cependant mis en évidence que lorsque la plasmine est recrutée par la GAPDH, le dépôt de C4b et C3b est réduit. La diminution de l'opsonisation par C3b grâce à l'activité protéolytique de la plasmine participe ainsi probablement à l'échappement à la phagocytose.

I-ix-4- Déterminants moléculaires de l'interaction GAPDH-C1q

Les résultats obtenus au cours de ce travail ont montré que les GAPDH humaine et du pneumocoque sont toutes deux reconnues par C1q mais que seule la GAPDH du pneumocoque active le complément. Nous avons donc cherché à étudier les interactions entre la GAPDH du pneumocoque et C1q dans l'espoir de mettre en évidence, par comparaison avec la GAPDH humaine, les déterminants structuraux impliqués dans l'activation du complexe C1, afin de comprendre comment C1q discrimine ses ligands pour n'activer le complément qu'en cas de reconnaissance d'un ligand signalant un danger. Dans le cadre de ce travail nous avons produit et purifié des quantités de GAPDH du pneumocoque recombinante suffisantes pour permettre la résolution de sa structure cristallographique par nos collaborateurs Christophe Moreau et Christine Gaboriaud (IBS, groupe IRPAS). En parallèle une approche de « peptide mapping » a été appliquée pour identifier des séquences peptidiques de la GAPDH susceptibles d'interagir avec C1q. La combinaison des résultats obtenus avec la structure cristallographique de la GAPDH a permis de mettre en évidence plusieurs résidus chargés ou polaires potentiellement impliqués dans l'interaction entre la GAPDH du pneumocoque et C1q. La substitution de ces résidus par des acides aminés non-polaires a été réalisée par mutagenèse dirigée. Les mutants simples ainsi obtenus ont été

produits et purifiés. Les expériences d'interaction en phase solide menées jusqu'à présent avec ces formes mutantes n'ont pas permis de mettre en évidence de différence de fixation à C1q.

I-ix-5- Mécanismes d'export de la GAPDH chez le pneumocoque

Jusqu'à présent, aucune étude n'avait été menée afin de déterminer comment la GAPDH du pneumocoque transite depuis le cytoplasme vers la surface de la bactérie. Au cours de ce travail nous avons donc cherché à élucider le mécanisme d'export de la GAPDH du pneumocoque. Ayant exclu les mécanismes de sécrétion actifs généralement impliqués dans l'export de protéines, nous avons entrepris de tester l'hypothèse selon laquelle la GAPDH pouvait être relarguée par la lyse bactérienne au cours de la croissance. Pour cela nous avons mesuré et comparé la quantité de GAPDH présente en surface de pneumocoque de souche R6 et d'un mutant de délétion du gène *lyzA*, qui ne présente pas d'activité autolytique. Nous avons fait de même pour la souche R6 cultivée en présence ou en absence de choline, qui permet d'inhiber la fixation de la plupart des hydrolases du peptidoglycane à la surface de la bactérie, ces enzymes impliquées dans la lyse bactérienne étant pour la plupart des CBP chez le pneumocoque. Les résultats obtenus montrent que l'inhibition de la lyse chez le pneumocoque réduit drastiquement l'expression de GAPDH en surface, confirmant que c'est bien la lyse qui permet le relargage de cette protéine cytoplasmique. En utilisant des tests d'interaction en phase solide et en solution sur des sacculi de pneumocoque, nous avons également pu mettre en évidence que la GAPDH se lie au peptidoglycane de la bactérie.

II- Matériel et méthodes

II-i- Souches, vecteurs et milieux de culture

II-i-1- Souche d'*E. coli*

Deux souches bactériennes d' *Escherichia coli* ont été utilisées pour cette étude :

- *E. coli* XL-10gold (*Stratagene*) : endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte $\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173 \text{tet}^R \text{F}'[\text{proAB lacI}^q\text{Z}\Delta\text{M15 Tn10}(\text{Tet}^R \text{Amy Cm}^R)]$

- *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL (*Stratagene*) : $\text{F}^- \text{ompT hsdS}_B(\text{r}_B^- \text{m}_B^-) \text{dcm lon Tet}^R \text{gal } \lambda(\text{DE3} [\text{lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5}]) \text{endA Hte} [\text{argU ileY leuW Cam}^R]$

II-i-2- Souches de pneumocoque

La souche de *Streptococcus pneumoniae* R6 utilisée dans cette étude est un dérivé non capsulé de la souche R36A (Rockefeller University), elle-même dérivée de l'isolat clinique de sérotype 2 D39. La souche sauvage R6-WT et le mutant R6-HBtail ont été cultivés en milieu Todd Hewitt (*BD Sciences*), en conditions anaérobie.

II-i-3- Vecteurs

II-i-3-a- Le vecteur pLIM01

Le vecteur pLIM01 est dérivé du vecteur d'expression pLX02 de *PX Therapeutics* (Grenoble), lui-même adapté du vecteur pQE80. Il présente une cassette de résistance à l'ampicilline et un site de clonage sans ligase (LIC) permettant de fusionner six résidus histidine du côté N-terminal de la protéine d'intérêt. Le site de clonage est précédé d'un promoteur T5, d'un opérateur lactose ainsi que d'un RBS (Ribosome Binding Site). Ce plasmide porte le gène *lacIq* qui permet de réprimer la transcription du gène par fixation du répresseur LacI au niveau de l'opérateur lactose. En présence d'IPTG celle-ci fixe le répresseur, l'ADN polymérase T5 d'*E.coli* peut alors transcrire le gène d'intérêt.

II-i-3-b- Le vecteur pETDuet

Le vecteur pETDuet présente une cassette de résistance à l'ampicilline et deux sites de clonage nommés MCS1 et MCS2 (pour Multiple Cloning Sites). Chacun d'eux est précédé d'un promoteur T7, d'un opérateur lactose et d'un RBS. Le MCS1 permet l'ajout d'une séquence codant pour une étiquette poly-histidine en amont du gène à cloner. Le MCS2, permet l'ajout d'une séquence codant pour un S-Tag en aval du gène à cloner, celui-ci étant suivi d'un codon stop. Ce plasmide porte le gène *lacI* qui permet de réprimer la transcription

du gène par fixation du répresseur LacI au niveau de l'opérateur lactose. L'induction par l'IPTG de l'expression de protéines à partir de ce plasmide n'est cependant pas directe, et nécessite la présence du phage DE3 qui permet l'expression de l'ADN polymérase T7, placée sous le contrôle d'un promoteur lacUV5 inductible par l'IPTG.

II-i-4- Constructions

II-i-4-a- Clonage de la GAPDH du pneumocoque

La GAPDH du pneumocoque a été clonée dans le plasmide pLIM01 par Anne-Marie Di Guilmi. De l'ADN génomique obtenu à partir de la souche D39 de *S. pneumoniae* a été utilisé comme matrice pour l'amplification du gène *gapA* (sp2012) par PCR conventionnelle. Le produit PCR obtenu et le plasmide de d'estimation pLIM01 préalablement linéarisé ont été traité avec l'ADN polymérase T4 puis hybridés, selon la méthode de clonage indépendant de la ligase (LIC). La construction obtenue, pLIM01-GAPDHSpn, code pour la GAPDH du pneumocoque complète fusionnée à une étiquette poly-histidine (6xHis) du côté N-terminal. Un site de clivage à la protéase TEV (Tobacco Etch Virus) est inséré entre l'étiquette 6xHis et la séquence de la GAPDH.

II-i-4-b- Clonage de la GAPDH humaine

La GAPDH humaine a été clonée dans le MCS1 du plasmide pETDuet par Philippe Frachet. Un cDNA commercial (GAPDH, NCBI Reference Sequence NM_002046, human cDNA clone, *Origene*) a été utilisé comme matrice pour l'amplification du gène *gapdh* par PCR conventionnelle, la séquence codant pour le site de clivage à la TEV a été ajouté à l'extrémité 5' lors de la procédure. Le produit PCR obtenu a été cloné dans le MCS1 du plasmide pETDuet (*Novagen*) afin de fusionner une étiquette poly-histidine (6xHis) à l'extrémité N-terminal de la GAPDH humaine. Le vecteur obtenu a été nommé pETDuet-GAPDHHsa.

II-i-4-c- Construction du produit PCR destiné à introduire la mutation gapA-HBtail chez le pneumocoque

Le plasmide pLIM01-GAPDHSpn a été utilisé comme matrice afin d'insérer la séquence codant la queue hydrophobe IVLVGLVMLLLS directement en 3' de *gapA*. Une mutagenèse par PCR a été réalisée en utilisant les amorces 1 et 2 (Annexe 1) introduisant la séquence voulue.

Afin de remplacer le gène *gapA* par *gapAHBtail* dans le génome du pneumocoque, un produit PCR permettant une recombinaison homologe a ensuite été construit. Dans un premier temps, trois fragments différents ont été amplifiés :

- un fragment à partir de pLIM01-GAPDH-HBtail en utilisant les amorces 3 et 4,
- un fragment codant pour la chloramphénicol N-acétyl transférase, enzyme conférant la résistance au chloramphénicol, à partir de pR326 en utilisant les amorces 5 et 6,
- un fragment correspondant à la séquence en aval de *gapA* dans le génome à partir d'ADN génomique de R6 en utilisant les amorces 7 et 8.

Les amorces ayant été construites pour générer des fragments chevauchants, le produit final a été amplifié par PCR à partir de ces trois fragments avec les amorces 3 et 8.

II-i-5- Milieux de culture

Les souches *E. coli* sont cultivées en milieu riche.

Milieux liquides :

- Lysogeny Broth (LB) : contenant 10 g de Bacto-Tryptone, 5 g de Bacto-Yeast extract et 5 g de NaCl par litre (milieu destiné aux précultures).
- Terrific Broth (TB) : contenant 12 g de Bacto-Tryptone, 24 g de Bacto-Yeast Extract et 4 ml de glycérol par litre (milieu destiné aux cultures).
- Super Optimal Broth (SOB) : contenant 20 g de Bacto-Tryptone, 5 g de Bacto-Yeast Extract, 0,5 g de NaCl et 2,5 mL de 1 M KCl par litre auxquels sont ajoutés 10 mL de 1 M MgCl₂.
- Super Optimal Broth with Catabolite repression (SOC) : contenant du SOB supplémenté de 20 mL de 1 M glucose stérile (milieu utilisé pour les cultures bactérienne fraîchement transformées).

Milieu solide :

- LB supplémenté de 15 g d'agar.

Les souches *S. pneumoniae* sont cultivées en milieu riche.

- Milieu liquide Todd Hewitt Broth (TH, *BD Sciences*) : contenant 3,1 g d'infusion de cœur de bœuf (solide), 20 g de Peptone, 2 g de dextrose, 2 g de NaCl, 0,4 g de Na_3PO_4 , 2,5 g de Na_2CO_3 par litre.
- Milieu solide Columbia Blood Agar (CBA, *BD Sciences*) : contenant 12 g de Pantone, 6 g de Bitone H Plus, 3 g de Peptone, 1 g d'amidon, 5 g de NaCl et 12 g d'Agar par litre auxquels sont ajoutés 40 mL de sang de cheval défibriné.

II-i-6- Antibiotiques

L'ampicilline (Euromedex) est ajoutée aux milieux de culture de *E. coli* à une concentration finale de 100 $\mu\text{g/mL}$. Le chloramphénicol (Euromedex) est si nécessaire ajouté aux milieux de culture de *S. pneumoniae* à une concentration finale de 3,4 $\mu\text{g/mL}$.

II-ii- Techniques de biologie moléculaire

II-ii-1- Mutagenèse

Les mutations ont été introduites dans le vecteur pLIM01-GAPDHSpn par mutagenèse dirigée par PCR à l'aide du kit QuickChange® II XL commercialisé par *Stratagene*.

Mélange réactionnel:

- 10 ng de matrice ADN (vecteur pLIM01-GAPDHSpn)
- 125 ng oligonucléotide F
- 125ng oligonucléotide R
- 1 µl dNTP mix
- 5 µl Tampon de réaction 10X
- 3 µl Quick solution
- 34,5 µl H₂O
- + 1µl Pfu Ultra (2,5 U/µl)

La mutagenèse nécessite 18 cycles PCR des étapes suivantes:

- Dénaturation de la matrice à 98°C durant 50 secondes
- 50 secondes d'hybridation spécifique des oligonucléotides à une température fonction de la composition en AT et GC de ces derniers
- Elongation à 68°C avec l'ADN polymérase à raison de 1 min par kilobase d'ADN

Le produit PCR est ensuite digéré 1h à 37°C par l'enzyme DpnI qui a pour particularité de digérer uniquement l'ADN méthylé, donc la matrice ADN. Le produit PCR traité à la DpnI peut ensuite servir à transformer les bactéries *E. coli* XL-10 gold compétentes.

II-ii-2- Transformation des cellules compétentes

II-ii-2-a- Transformation dans E. coli

1 µl de PCR de mutagenèse est incubé en présence de 50 µl de cellules compétentes pendant 30 minutes dans la glace, puis soumis à un choc thermique à 42°C pendant 45 secondes. Les cellules sont ensuite placées dans la glace durant 2 minutes puis incubées durant 1h à 37°C sous agitation dans 450 µl de milieu SOC. Les 500 µL de cultures

bactériennes sont finalement étalé sur boîte de pétri contenant du LB agar supplémenté de 100 µg/mL d'ampicilline. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C toute la nuit.

II-ii-2-b- Transformation dans S. pneumoniae R6

Pour la transformation dans la souche R6, 100 µL de cellules compétentes ont été diluées avec 900 µL de C-medium. Environ 100 ng de produit PCR a ensuite été ajouté et les cellules incubées 30 min à 30°C puis 2h à 37°C et enfin 10 min à 4°C. Les transformant ont été sélectionnés sur boîte Columbia Blood Agar (4% sang de cheval défibriné) supplémenté de 3,4 µg/mL de chloramphénicol. La présence de l'insertion dans le génome a été vérifiée par PCR avec les amorces 3 et 8 et la localisation correcte avec les amorces 9 et 10.

II-ii-3- Mini préparation d'ADN plasmidique et séquençage

Pour chaque vecteur réalisé, deux colonies ont été sélectionnées aléatoirement et cultivées 16h à 37°C dans 4 ml de LB contenant 100 µg/mL d'ampicilline. 1 ml de cette culture permet de constituer un stock glycérolé conservé à -80°C et sur les 3 ml restants, l'ADN plasmidique est extrait à l'aide du kit Nucleospin Plasmid QuikPure (*Stratagene*). Chacun des vecteurs réalisés lors de cette étude a été vérifié par séquençage (*Beckman Coulter*).

II-iii- Techniques biochimiques

II-iii-1- Production des protéines recombinantes

Une culture en phase stationnaire de la souche d'*Escherichia coli* BL21(DE3)RIL (*Stratagene*) transformée avec le plasmide approprié est utilisée pour inoculer 1 L de milieu Terrific Broth + ampicilline (100 µg/mL) et cultivé 3h à 37°C. La production de protéine recombinante est induite par ajout de 1 mL d'IPTG à 0.5M et la culture est poursuivie 16h à 15°C. Les cultures sont ensuite centrifugés 10 minutes à 4000 g et 4°C, les culots repris dans 50 mL d'un tampon 50 mM Tris / 200 mM NaCl / 20 mM Imidazole (pH 8,0) contenant une pastille de Complete EDTA-free (*Roche*) et lysés par sonication. Les lysats sont centrifugés 20 minutes à 40000 g et 4 °C et le surnageant récupéré pour purification.

II-iii-2- Purification des protéines recombinantes

La purification est réalisée par chromatographie d'affinité au nickel sur une colonne HisTrap (1 ml) (*GE Healthcare*), le lavage est effectué avec 45 ml d'un tampon 50 mM Tris / 200 mM NaCl / 20 mM Imidazole (pH 8,0), l'élution est réalisée en trois paliers de 10 ml avec des concentrations d'Imidazole à 60 mM, 100 mM et 300 mM d'Imidazole. Après électrophorèse sur gel polyacrylamide 12.5% en conditions dénaturantes d'échantillons des fractions d'intérêt identifiées sur le chromatogramme, les fractions contenant la protéine sont rassemblées et concentrées sur une unité de concentration Amicon Ultra-15 10 kDa (*Merck Millipore*). Une chromatographie d'exclusion de taille est ensuite réalisée sur une colonne Superdex 200 (*GE healthcare*) avec un tampon de course 10 mM HEPES / 150 mM NaCl / 2 mM CaCl₂ (pH 7,4).

Les concentrations sont estimées par spectrométrie à partir de l'absorbance à 280 nm. Ces mesures sont réalisées à l'aide d'un appareil NanoVue (*GE Healthcare*), permettant l'utilisation d'un très faible volume d'échantillon, soit de 2 µl.

II-iii-3- Analyse des protéines par électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Les échantillons protéiques sont incubés avec une solution de bleu Laemmli de concentration finale 1X (Composition 1X : 62,5mM Tris pH 6,8 / 0,4% SDS / 650 mM β-mercaptoéthanol / 10% glycérol / 0,1% bleu de bromophénol) puis chauffés à 100°C durant 10 minutes. Les échantillons sont ensuite chargés sur des gels de polyacrylamide 12,5%. La

migration est réalisée à 200V dans un tampon d'électrophorèse réalisé au laboratoire (25 mM Tris / 0,1% SDS / 192 mM Glycine).

II-iii-4- Coloration des protéines au bleu de Coomassie

Le gel de protéine est plongé durant 30 minutes dans une solution de coloration (50% éthanol, 8% acide acétique, 0.25% Coomassie R250) puis rincé à l'eau et décoloré par une solution de décoloration (5% éthanol, 7,5% acide acétique).

II-iii-5- Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose

Les protéines séparées par SDS-PAGE sont electro-transférées sur une membrane de nitrocellulose (*BioRad*) à un voltage de 100V durant 30 minutes. Le transfert est réalisé à froid en présence d'un tampon TransBlot réalisé au laboratoire (25 mM Tris / 190 mM Glycine).

II-iii-6-Immunorévélation des protéines sur membrane de nitrocellulose (Western blot)

Les membranes de nitrocellulose sont saturées dans une solution de PBS / 0,3% Tween 20 / 5% lait durant une heure. Les membranes de nitrocellulose sont incubées durant 1h avec des anticorps primaires polyclonaux anti-C1q, ou anti-C3 (*Abcam* ab97462) qui ont été produits chez des lapins. Ces anticorps sont utilisés dilués au 1/5000^{ème} dans une solution de PBS / 0,3% Tween 20 / 5% lait. Après 3 lavages au PBS / 0,3% Tween 20, la membrane est incubée durant 1h avec des anticorps secondaires anti-lapin couplés à la HRP dilués au 1/10000^{ème} dans une solution de PBS / 0,3% Tween 20 / 5% lait. Les membranes de nitrocellulose sont ensuite lavées 3 fois par une solution de PBS / 0,3% Tween 20, puis révélées par chimioluminescence (ECL, *Pierce*).

II-iii-7- Immobilisation de peptides sur membrane de nitrocellulose

Les peptides synthétisés par la société *Millegen* (voir annexe 3) sont solubilisés dans l'eau à une concentration de 100 µg/mL. 10 µg de chaque peptide, de GAPDH du pneumocoque recombinante, ou de BSA, soit 100 µL de solution à 100 µg/mL, sont immobilisés sur une membrane de nitrocellulose préalablement équilibrée en PBS. L'immobilisation est réalisée grâce à un dispositif Dot Blotter (*Denville Scientific*) qui permet de drainer les solutions de peptides à travers la membrane en formant des spots de 3 mm de diamètre. Les spots sont ensuite lavés par 200 µL de PBS avant utilisation de la membrane.

II-iii-8- Immunorévélation d'interactions protéines-peptides sur membrane de nitrocellulose (Dot blot)

Les membranes de nitrocellulose sont saturées dans une solution de PBS / 0,3% Tween 20 / 5% lait durant une heure. Les membranes de nitrocellulose sont ensuite incubées durant 2h avec une solution à 10 µg/mL de C1q (IBS, groupe IPAS) ou de plasminogène (*Sigma-Aldrich* P7999) dans un tampon 10 mM HEPES / 150 mM NaCl / 2 mM CaCl₂ / 0,2% gelatine / 0,05% Tween 20 (pH 7,4). Après 3 lavages au PBS / 0,3% Tween 20, Les membranes de nitrocellulose sont incubées durant 1h avec des anticorps primaires polyclonaux anti-C1q, ou anti-Plg (*Abcam* ab6189), produits respectivement chez le lapin et la chèvre. Ces anticorps sont utilisés dilués au 1/5000^{ème} dans une solution de PBS / 0,3% Tween 20 / 5% lait. Après 3 lavages au PBS / 0,3% Tween 20, la membrane est incubée durant 1h avec des anticorps secondaires anti-lapin ou anti-chèvre couplés à la HRP dilués au 1/10000^{ème} dans une solution de PBS / 0,3% Tween 20 / 5% lait. Les membranes de nitrocellulose sont ensuite lavées 3 fois par une solution de PBS / 0,3% Tween 20, puis révélées par chimioluminescence (ECL, *Pierce*).

II-iii-9- Déplétion des IgG sériques

Le sérum humain normal (NHS), résultant du mélange des séra obtenu à partir de prélèvements de sang de trois donneurs, est déplété de ses IgG par un traitement sur Protéine A-Sepharose réalisé à température ambiante. 250 mg de Protéine A-Sepharose CL-4B (*GE healthcare* 17-0780-01) sont resuspendus dans l'eau et la suspension est transférée dans une colonne en plastique équipée d'un verre fritté. Après sédimentation, la résine est lavée avec 50 mL d'eau, puis équilibrée avec 15 mL d'un tampon 10 mM HEPES / 150 mM NaCl / 2 mM CaCl₂ (pH 7,4). 1 mL de NHS est ensuite ajouté à la résine et incubé pendant 5 minutes. Le sérum déplété en IgG (NHSΔIgG) est ensuite exclu de la résine par l'ajout de 1 mL de tampon 10 mM HEPES / 150 mM NaCl / 2 mM CaCl₂ (pH 7,4) et collecté. Les IgG fixées à la Protéine A-Sepharose sont éluées par un traitement à l'aide de 2 mL de tampon 100 mM Glycine (pH 3,0). L'absence d'IgG dans le NHSΔIgG est vérifiée par SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie et Western blot.

II-iii-10- Mesure d'activité plasmine

La GAPDH recombinante du pneumocoque est immobilisée en plaque 96 puits high binding transparente (*Greiner* 655081) par adsorption pendant 16h à 4°C de différentes quantités de protéine (0,1 ; 0,5 ; 1 ; 5 ; 10 µg) diluées dans 100 µL de tampon PBS. 10 µg de

BSA (*Sigma-Aldrich* A7030) sont immobilisés dans les mêmes conditions comme contrôle négatif. Chaque puits est ensuite saturé pendant 30 minutes à température ambiante avec 100 μ L de PBS / 1% BSA. Après 3 lavages au PBS, 50 μ L de PBS contenant ou non 2 μ g de plasminogène (*Sigma-Aldrich* P7999) sont ajoutés dans chaque puits et incubés pendant 45 minutes à 37°C. Après 3 lavages au PBS, 50 μ L d'une solution à 50 nM de streptokinase (*Sigma-Aldrich* S8026) en PBS sont ajoutés dans chaque puits et incubés pendant 30 minutes à température ambiante. Après 3 lavages au PBS, 50 μ L d'une solution à 500 μ M de *N*-(p-Tosyl)-Gly-Pro-Lys 4-nitroanilide acetate (un substrat chromogénique de la plasmine) en PBS sont ajoutés dans chaque puits et incubés pendant 30 minutes à 37°C. L'absorbance à 410 nm est ensuite mesurée dans chaque puits à l'aide d'un lecteur de plaques multipuits FluoStar OPTIMA (*BMG Labtech*). Le contrôle positif consistant en un mélange de 2 μ g de plasminogène, 50 nM de streptokinase et 500 μ M de *N*-(p-Tosyl)-Gly-Pro-Lys 4-nitroanilide acetate dans 50 μ L de PBS est préparé indépendamment et ajouté dans la plaque 96 puits avant la lecture.

II-iii-11- Mesure du dépôt du complément et des IgG sur les GAPDH

Le dépôt de protéines du complément ou des IgG lors du traitement des GAPDH avec du sérum a été mesuré dans des plaques 96-puits high binding blanches (*Greiner* 655061). Dans chaque puits, 1 μ g de GAPDH Spn, GAPDH Hsa ou gélatine dilués dans 100 μ L de tampon 10 mM HEPES / 150 mM NaCl / 2 mM CaCl₂ (pH 7,4) sont incubés pendant 16h à 4°C. Les puits sont ensuite saturés pendant 1h à température ambiante avec 100 μ L de tampon 10 mM HEPES / 150 mM NaCl / 2 mM CaCl₂ / 0,2% gelatine (pH 7,4). Le sérum (NHS, NHS Δ C1q (*Calbiochem* 234401), NHS Δ IgG) dilué au 1/25^{ème} en tampon 10 mM HEPES / 150 mM NaCl / 2 mM CaCl₂ (pH 7,4), ou le tampon seul, est ensuite ajouté à chaque puits et incubé 1h30 à température ambiante. Le dépôt de C1q, C4b, C3b ou d'IgG est détecté en ajoutant 100 μ L par puits d'anticorps primaires polyclonaux anti-C1q, anti-C4 (*Abcam* ab48612), anti-C3 (*Abcam* ab97462) ou anti-IgG (*Abcam* ab48386) dilués au 1/1000^{ème} en tampon 10 mM HEPES / 150 mM NaCl / 2 mM CaCl₂ / 0,02% gelatine (pH 7,4) pour 1h à température ambiante, suivi d'anticorps secondaires anti-lapin couplés à la HRP dilués au 1/1000^{ème} en tampon 10 mM HEPES / 150 mM NaCl / 2 mM CaCl₂ / 0,02% gelatine (pH 7,4). Le test est révélé avec 100 μ L d'ECL (*Pierce*) et la luminescence est mesurée dans chaque puits à l'aide d'un lecteur de plaques multipuits FluoStar OPTIMA (*BMG Labtech*). Entre chaque étape 3 lavages avec 100 μ L de tampon 10 mM HEPES / 150 mM NaCl / 2 mM CaCl₂ (pH 7,4) sont effectués. Pour les tests de dépôt en présence de plasmine, 4 μ g de plasminogène (*Sigma-*

Aldrich P7999) dilué dans 100 µL de tampon 10 mM HEPES / 150 mM NaCl / 2 mM CaCl₂ (pH 7,4) ou le tampon seul sont ajoutés dans chaque puits et incubés 45 minutes à 37°C après l'étape de saturation. Pour provoquer l'activation du plasminogène en plasmine, 50 nM de streptokinase (*Sigma-Aldrich S8026*) sont ajoutés à la dilution de sérum.

II-iii-12- Mesure du dépôt du complément sur le pneumocoque

Le dépôt de protéines du complément lors du traitement du pneumocoque avec du sérum a été mesuré dans des plaques 96-puits high binding blanches (*Greiner 655061*). Dans chaque puits, 100 µL d'une suspension à 100.10⁶ CFU de R6-WT ou R6-HBt par mL en tampon 10 mM HEPES / 150 mM NaCl / 2 mM CaCl₂ (pH 7,4) (ou 100 µL du même tampon contenant 0,2% de gelatine) sont incubés pendant 2h à température ambiante. Les puits sont ensuite saturés pendant 1h à température ambiante avec 100 µL de tampon 10 mM HEPES / 150 mM NaCl / 2 mM CaCl₂ / 0,2% gelatine (pH 7,4). Le sérum (NHS, NHSΔC1q (*Calbiochem 234401*), NHSΔIgG) dilué au 1/25^{ème} en tampon 10 mM HEPES / 150 mM NaCl / 2 mM CaCl₂ (pH 7,4), ou le tampon seul, est ensuite ajouté à chaque puits et incubé 1h30 à température ambiante. Le dépôt de C1q, C4b et C3b est détecté en ajoutant 100 µL par puits d'anticorps primaires polyclonaux anti-C1q, anti-C4 (*abcam ab48612*) ou anti-C3 (*Abcam ab97462*) dilués au 1/1000^{ème} en tampon 10 mM HEPES / 150 mM NaCl / 2 mM CaCl₂ / 0,02% gelatine (pH 7,4) pour 1h à température ambiante, suivi d'anticorps secondaires anti-lapin couplés à la HRP dilués au 1/1000^{ème} en tampon 10 mM HEPES / 150 mM NaCl / 2 mM CaCl₂ / 0,02% gelatine (pH 7,4). Le test est révélé avec 100 µL d'ECL (*Pierce*) et la luminescence est mesurée dans chaque puits à l'aide d'un lecteur de plaques multipuits FluoStar OPTIMA (*BMG Labtech*). Entre chaque étape 2 lavages avec 100 µL de tampon 10 mM HEPES / 150 mM NaCl / 2 mM CaCl₂ (pH 7,4) sont effectués.

II-iii-13- Tests d'interaction et de compétition en phase solide

Les tests d'interaction en phase solide sont réalisés dans des plaques 96-puits high binding blanches (*Greiner 655061*). Pour l'adsorption des protéines, la quantité requise de C1q (IBS, groupe IRPAS), plasminogène (*Sigma-Aldrich P7999*) ou gelatine (*Sigma-Aldrich 48723*) diluées dans 100 µL de tampon 10 mM HEPES / 150 mM NaCl / 2 mM CaCl₂ (pH 7,4) est incubée pendant 16h à 4°C pour permettre l'adsorption des protéines. Chaque puits est ensuite saturé pendant 1h avec 200 µL de tampon 10 mM HEPES / 150 mM NaCl / 2 mM CaCl₂ / 0,2% gelatine (pH 7,4), après quoi 100 µL d'une solution contenant 1 µg de GAPDH Spn native recombinante ou de chaque mutant, ou 1 µg de GAPDH Spn et la quantité requise de

plasminogène pour les tests de compétition, sont ajoutés dans chaque puits et incubés pendant 1h. La fixation de la GAPDH est ensuite détectée par l'ajout d'un anticorps de lapin anti-GAPDH Spn dilué au 1/2000^e dans 100 µL de tampon 10 mM HEPES / 150 mM NaCl / 2 mM CaCl₂ / 0,02% gelatine (pH 7,4) pendant 1h, puis par un anticorps anti immunoglobulines de lapin couplé à la HRP, dilué au 1/12000^e dans 100 µL de tampon 10 mM HEPES / 150 mM NaCl / 2 mM CaCl₂ / 0,02% gelatine (pH 7,4) incubé pendant 1h. Le test est révélé avec 100 µL d'ECL (*Pierce*) et la luminescence est mesurée dans chaque puits à l'aide d'un lecteur de plaques multipuits FluoStar OPTIMA (*BMG Labtech*). Toutes les étapes après adsorption des protéines sont réalisées à température ambiante, entre chaque étape 3 lavages avec 100 µL de tampon 10 mM HEPES / 150 mM NaCl / 2 mM CaCl₂ (pH 7,4) sont effectués. Pour les tests de compétition avec les peptides de GAPDH, la quantité voulu de chaque peptide est diluée dans 100 µL de tampon 10 mM HEPES / 150 mM NaCl / 2 mM CaCl₂ (pH 7,4) et incubée 1h dans chaque puits, avant ajout de 1 µg de GAPDH.

II-iii-14- Test de compétition par SPR

Les mesures de Résonance Plasmonique de Surface sont réalisées en utilisant un appareil Biacore 3000 (*Biacore AB*). La GAPDH du pneumocoque recombinante (1,8 µg) est immobilisé de manière covalente à la matrice de dextran d'une sensorchip CM5 via les groupements amines (amine coupling kit, *Biacore AB*). La surface de dextran carboxyméthylée est activée par l'injection de 60 µL d'une mixture de 0,2 M EDC (*N*-ethyl-*N'*-(diethylamino-propyl)carbodiimide) et 0,05 M NHS (*N*-hydroxysuccinimide). La protéine est injectée diluée dans un tampon 10 mM acétate de sodium (pH 5,0). Les groupements *N*-hydroxysuccinimide esters n'ayant pas réagi sont ensuite bloqués par l'injection de 80 µL de 1 M éthanolamine HCl (pH 8,0). Toutes les étapes d'immobilisation sont réalisées à un débit de 10 µL/min. le niveau d'immobilisation de la GAPDH est d'environ 10000 RU. Aucune protéine n'est immobilisée sur la piste contrôle qui subi uniquement les étapes d'activation et de blocage. Le tampon de course utilisé pour les immobilisations est un tampon HBS-EP (10 mM HEPES / 150 mM NaCl / 3 mM EDTA / 0.005% détergent P20 (pH 7,4)).

Les tests de liaison sont réalisés à 25°C dans un tampon HBS-CP (10 mM HEPES / 150 mM NaCl / 2 mM CaCl₂ / 0.005% détergent P20 (pH 7,4)). Le plasminogène (*Sigma-Aldrich* P7999) ou C1q, au préalable dialysés contre le tampon HBS-CP, sont injectés à 10 nM à un débit de 30 µL/min. Le mélange équimolaire 10 nM plasminogène / 10 nM C1q est injecté au même débit. Dans toutes les expériences les phases d'association durent 180 secondes et

celles de dissociation 300 secondes. La surface est ensuite régénérée par plusieurs injections courtes de 10 mM NaOH. Les données obtenues sur la piste contrôle sont automatiquement soustraites à celles de la piste où la GAPDH est immobilisé.

**III- Étude des interactions GAPDH-C1q :
caractérisation et impact sur la réponse immune**

III-i- Présentation

La GAPDH du pneumocoque est une protéine « moonlighting » présente en surface de la bactérie et qui est impliquée dans le recrutement du plasminogène, un processus qui facilite l'invasion des tissus de l'hôte. Les GAPDH étant souvent capables d'interagir avec de multiples partenaires dans le cadre de leurs fonctions « moonlighting », nous avons cherché à déterminer si la GAPDH du pneumocoque pouvait interagir avec d'autres protéines de l'hôte.

Nos collaborateurs Phillippe Frachet et Pascale Tacnet (IBS, groupe IRPAS) ayant mis en évidence que la GAPDH humaine exposée en surface des cellules apoptotiques est un ligand de C1q, nous avons émis l'hypothèse que la GAPDH du pneumocoque, qui présente environ 50% d'identité de séquence avec la GAPDH humaine, pouvait être un ligand de C1q en surface du pneumocoque. Cette hypothèse nous conduit à envisager que la GAPDH du pneumocoque pourrait, par un mécanisme de mimétisme moléculaire, permettre au pneumocoque de se faire passer pour une cellule du soi, et ainsi limiter la réponse immunitaire. Nous avons donc dans un premier temps cherché à déterminer si la GAPDH du pneumocoque interagit avec C1q puis à étudier les conséquences de la reconnaissance des GAPDH humaine et du pneumocoque par C1q sur la réponse immunitaire.

Au cours de ce travail nous avons démontré et caractérisé par des approches biochimiques les interactions des GAPDH humaine et du pneumocoque avec C1q. Nous avons également montré grâce à des mutants réduisant son export que la GAPDH du pneumocoque est impliquée dans la reconnaissance de la bactérie par C1q. La combinaison d'approches biochimique et génétique a permis de montrer que la reconnaissance de la GAPDH en surface du pneumocoque par C1q permet l'activation du complément et l'opsonisation de la bactérie par C3b alors que la GAPDH humaine, même si reconnue par C1q n'induit pas l'activation du complément. Nous avons par la suite observé que la capacité de recrutement de la plasmine de la GAPDH du pneumocoque peut lui permettre de compenser cette activation du complément, en limitant l'opsonisation par C3b grâce à l'activité protéolytique de la plasmine.

III-ii- Article n°1

Human and pneumococcal cell surface GAPDH proteins are both ligands of human C1q.*

**Rémi Terrasse^{1¶}, Pascale Tacnet-Delorme^{2¶}, Christine Moriscot³, Julien Pérard⁴,
Guy Schoehn³, Thierry Vernet¹, Nicole M. Thielens², Anne Marie Di Guilmi^{1||}, and
Philippe Frachet^{2||}.**

¹Pneumococcus group (PG), ²Immune response to pathogens and altered self (IRPAS) group, and ³ Methods and Electron Microscopy group (MEM). Université Joseph Fourier Grenoble 1, Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, 38027 Grenoble, France; CNRS, Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, 38027 Grenoble, France; CEA, Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, 38027 Grenoble, France

⁴ Université Joseph Fourier, Unit for Virus Host Cell Interaction, UMI 3265 CNRS-EMBL-UJF, Grenoble, France

*Running title: GAPDH is a novel C1q ligand

¶Both authors contributed equally to this work.

|| Both authors are corresponding authors:

Dr. Philippe Frachet, Altered-Self Phagocytosis (ASP) team, Immune response to pathogens and altered self (IRPAS) group, Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1, France. Tel.: +33 4 38 78 41 37; Fax: +33 4 38 78 54 94.

E-mail : philippe.frachet@ibs.fr

Dr Anne-Marie Di Guilmi, Pneumococcus group (PG), Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1, France. Tel.: +33 4 38 78 56 34; Fax: +33 4 38 78 55 94.

E-mail : anne-marie.di-guilmi@ibs.fr

Keywords: C1q; GAPDH; apoptotic cells; *Streptococcus pneumoniae*

Background: C1q is a major molecule of the immune innate system. GAPDH exposed at the surface of cells is associated to the virulence of pathogens

Result: C1q binds GAPDH on human apoptotic and on pneumococcal cells.

Conclusion: GAPDH is a C1q ligand. Pneumococcal GAPDH - C1q interaction leads to complement activation.

Significance: This might bring new insights into host defense against pathogens.

SUMMARY

C1q, a key component of the classical complement pathway, is a major player in the response to microbial infection and has been shown to detect noxious altered-self substances like apoptotic cells. In this work, we identified, using complementary experimental approaches, the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a C1q partner when exposed at the surface of the human pathogenic bacteria *Streptococcus pneumoniae* and human apoptotic cells. The membrane-associated GAPDH on HeLa cells binds the globular regions of C1q as demonstrated by pull-down and cell surface co-localization experiments. Pneumococcal strains deficient in surface-exposed GAPDH harbor a decreased level of C1q recognition when compared to the wild-type strains. Both recombinant human and pneumococcal GAPDHs interact avidly with C1q as measured by SPR experiments ($K_D = 0.34$ to 2.17 nM). In addition, GAPDH-C1q complexes were observed by transmission electron microscopy after cross-linking. The purified pneumococcal GAPDH protein activates C1 in an *in vitro* assay unlike the human form. Deposition of C1q, C3b and C4b from human serum at the surface of pneumococcal cells is dependent on the presence of surface-exposed GAPDH. This ability of C1q to sense both human and bacterial GAPDHs sheds new insights on the role of this important defense collagen molecule in modulating the immune response.

INTRODUCTION

The soluble defense collagen C1q, as a major actor of the classical complement pathway, plays a crucial role in the response to microbial infection. However its importance has been reinforced by the discoveries of its capacities to detect a wide variety of noxious altered-self substances, such as beta-amyloid fibrils, the pathological form of the prion protein, apoptotic and necrotic cells, or modified forms of the low-density lipoprotein (1-8). Interestingly, unlike the other complement proteins, C1q is produced by macrophages and immature dendritic cells. Numerous studies have shown that C1q influences the phagocyte “status” through regulation of cytokine expression (7,8), and it may be involved in the non-immunogenic presentation of self-antigens through its ability to modulate maturation of dendritic cells (9). C1q globular regions (GR) mediate the binding to various molecules exposed at the surface of apoptotic cells such as phosphatidylserine, DNA, calreticulin and annexins A2 and A5 (10-15). Opsonisation with C1q facilitates the phagocytosis of pathogens and apoptotic cells, leading to different and appropriate adaptive responses (pro-inflammatory/immunogenic *versus* anti-inflammatory/tolerogenic). Consequently, pathogens might recruit C1q to subvert the host immune response by exploiting a tolerating outcome. To test this hypothesis, we looked for C1q ligands present at the surface of apoptotic cells that could be shared by pathogens.

The pathogen model used in this study is *Streptococcus pneumoniae*, a leading cause of meningitis, septicemia and pneumonia responsible worldwide for the death of around 1 million children under 5 years of age every year (16). The nasopharynx of small children constitutes the normal habitat for pneumococci and asymptomatic carriage usually occurs before and during the development of invasive diseases. The transition between the asymptomatic state towards the infectious behavior of the pneumococcus is poorly understood but is likely to be dependent on the host’s innate immune response. Within this context, the characterization of the immune response to *S. pneumoniae* is a high priority. One important component is the complement system among which the classical pathway is the dominant activation system, even though the alternative and lectin pathways play also some roles (17-20). Data from experimental infections in mice have suggested that the classical pathway can be activated by various innate immune mediators. They include natural IgM, antibodies to capsular and noncapsular antigens, pentraxin components of the acute-phase response such as C-reactive protein and serum amyloid P component as well as the macrophage lectin receptor SIGN-R1 (21). These data support the important role of the classical pathway for innate

immunity to *S. pneumoniae* and suggest that different immune mediators act as bridging molecules, by recognizing pneumococci surface components and C1q. However, direct C1q ligands have yet to be identified at the surface of *S. pneumoniae*.

In the present study, we demonstrate that human and pneumococcal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases (named herein Hsa and Spn GAPDHs, respectively) exposed at the cell surface are C1q partners. Besides its well-characterized function as glycolytic enzyme, GAPDH displays multiple functions in membrane fusion, transcriptional coactivation, DNA repair, apoptosis induction and regulation, transferrin binding and bacterial virulence (22-26). GAPDH is present on the surfaces of both prokaryotic and eukaryotic cells but the mechanism by which the protein is secreted and/or captured at the cell surface is not known (27-29). In pathogenic bacteria, including the Streptococcus family, surface-anchored GAPDH is associated with virulence due to its ability to bind different host proteins (30-32). Pneumococcal surface-exposed GAPDH binds plasminogen. Conversion of plasminogen to proteolytic-active plasmin form plays important roles in pathological processes, like the escape from blood clots and tissue invasion (33-35). To our knowledge, this is the first report of GAPDH/C1q interaction taking place in a comparable manner for eukaryotic and prokaryotic homologs but leading to different functional consequences in terms of complement activation.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Proteins, antibodies - C1q and the proenzyme C1s-C1r-C1r-C1s tetramer were purified from human serum and C1q globular regions (GR) were prepared and quantified as described previously (36). Mouse monoclonal anti-human GAPDH (Invitrogen, clone 258), rabbit polyclonal anti-human GAPDH (Sigma G9545), anti-human C4 (Abcam ab48612) and anti-human C3 (Abcam ab97462) antibodies were used. Rabbit polyclonal antibodies directed against human C1q and pneumococcal GAPDH were from IRPAS and Pneumococcus groups (IBS-Grenoble), respectively. Native purified human GAPDH was from Advanced Immunochemical Inc.

Cell culture - HeLa cells were cultivated in Glutamax D-MEM medium (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Jurkat and THP-1 cells were cultivated in Glutamax RPMI-1640 Medium (Invitrogen). Medium was supplemented with 10% (v/v) FCS, 2.5 U/ml penicillin and 2.5 mg/ml streptomycin. The cells were regularly tested for mycoplasma contamination (Mycoalert detection kit, Lonza). Apoptosis was induced and quantified as described previously (12). Briefly, cells were exposed to 1000 mJ/cm² UV-B irradiation at 312 nm in fresh medium. Cells were then incubated for the indicated times at 37°C under 5% CO₂.

Pneumococcal strains - *Streptococcus pneumoniae* R6 is a nonencapsulated avirulent strain, derivative of strain R36A, which itself derives from the capsular type 2 clinical isolate strain D39. R36A has multiple interruptions in the type 2 capsular locus inherited from D39. The R6 and D39 HBt (hydrophobic tail) mutants were generated as addressed later. The wild-type (R6 and D39) and HBtail mutant (R6 HBt and D39 HBt) strains were cultivated under anaerobic conditions in either Todd Hewitt broth (BD Sciences) for the R6 strains or Todd Hewitt broth supplemented with 0.5% yeast extract for the D39 strains. Whenever required, pneumococci were labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC). A 10 ml-bacterial culture in late-exponential growth phase (OD₆₀₀ ≈ 0.6) was harvested by centrifugation (10 min, 3,000 x g). Cells were washed with PBS before incubation with FITC at 1 mg/ml in 500 µl of PBS for 30 min at 4°C. Bacteria were washed three times with PBS before use.

Isolation of HeLa cell-surface biotinylated proteins - HeLa cell-surface proteins were biotinylated as follow: cells were washed two times with ice-cold PBS and biotinylated using biotinamidocaproate N-hydroxysuccinimide ester diluted in bicarbonate buffer (Amersham

Biosciences). After incubation at 4°C for 30 min under gentle shaking, cells were rinsed twice with ice-cold PBS to remove any remaining biotinylation reagent. The cells were then scraped and lysed in 1% Triton X-100, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ in PBS containing protease inhibitors (complete EDTA-free, Roche Diagnostics) and left at 4°C for 1 h. Insoluble material was removed by centrifugation at 20,800 x g for 30 min at 4°C. Soluble proteins present in the supernatant were quantified with a bicinchoninic acid assay (Sigma) and incubated with streptavidin-conjugated magnetic beads (Dynabeads MyOne Streptavidin T1; Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway) under rotation for 90 min at 4 °C. The beads were collected with a magnet and washed eight times with PBS–0.1% Tween 20. Biotinylated proteins were eluted by boiling the beads with 40 µl of 2X Laemmli sample buffer for 5 min at 100°C. The amount of biotinylated surface-exposed GAPDH was determined by Western blotting using an anti-human GAPDH antibody.

Preparation of HeLa cells plasma membrane proteins - Culture dishes (100 mm) of HeLa cells were harvested by scraping and incubated on ice for 20 min in hypotonic buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.6) containing protease inhibitors) and disrupted by Dounce homogenization. The homogenate was centrifuged at 3,000 x g for 10 min. The supernatant was collected and further centrifuged at 220,000 x g for 30 min. The cell membrane containing pellet was then solubilized in PBS containing 1% Triton X-100, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ and protease inhibitors for 1 h at 4°C. Solubilized membrane proteins were collected from the supernatant by 30 min centrifugation at 220,000 x g.

C1qGR overlay binding assay - Solubilized membrane proteins (10 µg) were subjected to electrophoresis using a 10% SDS – polyacrylamide gel and transferred to Immobilon-P membrane (Millipore). The membrane was subsequently blocked with 3% BSA in PBS–0.1% Tween 20 at room temperature (RT) for 1 h and washed 3 times with PBS–0.1% Tween 20. Putative streptavidin binding sites were blocked using a streptavidin/biotin blocking kit (SP-2002, Vector Laboratories). The membrane was washed briefly before incubation with biotinylated-C1qGRs (2.5 µg/ml) for 2 h (C1qGRs were biotinylated using the ECL protein biotin system (Amersham Biosciences), according to the manufacturer's instructions). After extensive washes, the membrane was incubated with streptavidin conjugated to horseradish peroxidase for 1 h allowing detection of the bound biotinylated C1qGRs by chemiluminescence (Supersignal West Pico Chemiluminescent substrate, Pierce).

Pull-down experiments - Biotinylated C1qGR were added to 80 μ l of preequilibrated streptavidin-conjugated magnetic beads. The mixture was incubated for 30 min at RT under rotation. The beads were pelleted and the supernatant removed. After six washes with PBS-1% BSA, the beads were incubated with plasma membrane proteins for 4 h at 4°C with gentle rocking. The beads were then pelleted and supernatants collected. After seven washes with 0.1% Triton X-100, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ in PBS, bound proteins were eluted by addition of 40 μ l of 2X Laemmli sample buffer and incubated at 100°C for 10 min. Used as a control the same experiment was performed with 80 μ l of streptavidin magnetic beads not coupled to biotinylated C1qGRs or coupled to free biotin. Detection of GAPDH was performed by Western blotting using an anti-human GAPDH antibody.

Flow cytometry - HeLa cells were harvested using trypsin-EDTA solution (Invitrogen). Cells (0.5 x 10⁶/ml) were washed twice, re-suspended in PBS, fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at RT, re-suspended in PBS-1% BSA. Monoclonal anti-human GAPDH antibody was diluted 1:250 and incubated with cells for 45 min on ice. An isotype antibody was used as a control. After two washes, cells were re-suspended in PBS and incubated on ice for 30 min with FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) diluted 1:200 and analyzed with a FACScan flow cytometer using the Cellquest software (Becton-Dickinson).

Production and purification of recombinant pneumococcal and human GAPDH - Genomic DNA from the D39 strain of *S. pneumoniae* was used as a template to amplify the *gapdh* gene (Sp2012) by conventional PCR methodology. The resulting PCR product was cloned into the pLIM01 vector (PX'Therapeutics SA, Grenoble) that had been modified from pQE80 by insertion of patented sequences, allowing a ligase-independent cloning procedure. The resulting construct, pLIM01/*gapdh*, encodes the full-length GAPDH protein fused to a His6-tag at the N-terminus. A tobacco etch virus (Tev) protease cleavage site was inserted between the His6 tag and the N-terminal sequence of GAPDH. DNA sequencing confirmed that no mutation had been introduced during PCR. The human *gapdh* gene has been amplified from cDNA (GAPDH NM_002046 human cDNA clone, Origene) and a Tev cleavage site has been introduced at the 5' extremity. The resulting PCR product was cloned into the pETDuet vector (Novagen) in order to fuse a His6-tag at the N-terminus of the human GAPDH sequence. Overnight cultures of the *Escherichia coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL (Stratagene) strain transformed with the Hsa (human) or Spn (pneumococcal) GAPDH

expression constructs were used for inoculation with 500 ml of Terrific Broth medium (Euromedex) supplemented with 100 µg/ml of ampicillin and cultured at 37°C for 3 h. Protein expression was induced with 0.5 mM isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside for 16 h at 15°C. After sonication and centrifugation of the lysate (20 min, 40,000 x g), recombinant Hsa and Spn GAPDH proteins were recovered from the soluble fraction and loaded onto a 1-ml prepacked HisTrap HP column (GE Healthcare). Column equilibration buffer was 50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 20 mM imidazole (pH 8.0). After extensive washing, recombinant proteins were eluted with 60, 100, 300 and 500 mM imidazole steps in 50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl (pH 8.0) buffer and subsequently dialyzed against 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂ (pH 7.4) before use for biological assays. The degree of protein purity was checked by Coomassie Blue staining of SDS-polyacrylamide gels. Protein concentrations were determined by absorbance at 280 nm.

Construction of the hydrophobic tail (HBt) mutant pneumococcal strains - The R6 and D39 HBt mutant strains were generated by insertion of a hydrophobic tail (IVLVGLVMLLLS) at the 3' end of the *gapdh* gene as described previously (37). Complementary primers used for insertion (QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis kit, Agilent Technologies) of this sequence in the pLIM01-rGAPDH vector were: GAPDH-1: AATACTTCGCAAAGATTGCTAAAATTGTTCTTGTGGCCTGTTATGCTTCTTCTTCTTCTTCAATTGGATGGTGACCTCGAGCG; GAPDH-2: GCTCGAGGTCACCATCCAATTGATTAAGAAAGAAGAAGCATAACCAGGCCAACAAGAACAATTTTAGCAATCTTTGCGAAGTATTC. In order to construct the recombination product, three overlapping fragments were PCR-amplified: (1) a 604 nucleotides fragment comprising the 3' end of the *gapdh* gene, the hydrophobic tail, and the 5' region of the *cat* gene (GAPDH-3: GCTTGGCTCCAATGGCTAAAGCTC and GAPDH-4: TCAAACAAATTTTCAT CAAGCTTTTAAGAAAGAAGAAGCATAACCAGGCC); (2) a 1084 nucleotides fragment comprising the *cat* gene, the 3' end of the hydrophobic tail and the sequence downstream of the *gapdh* gene (GAPDH-5: GGCCTGGTTATGCTTCTTCTTCTTAAAAGCTTGATGAAAATTTGTTTGA; GAPDH-6: GCTTTCTATCAACTCAAGAATTATCTAGAACTAGTGGATCCCCCGG-3') and (3) a 552 nucleotides fragment comprising the sequence downstream of the *gapdh* gene overlapping the *cat* gene (GAPDH-7: CCGGGGGATCCACTAGTTCTAGATAATTCTTGAGTTGATAGAAAGC, GAPDH-8: GCCAAAATCCTTTTATCCTGCCC. These 3 fragments were PCR-assembled using

primers GAPDH-3 and GAPDH-8 and R6 or D39 strains competent cells were transformed with the recombination product and plated onto chloramphenicol-containing Columbia blood agar. Mutant strains were selected twice and insertion was verified by PCR amplifications using primers flanking the recombination product.

Solid-phase binding assay - Solid-phase binding assays were performed to measure binding of Hsa and Spn GAPDH proteins to C1q and plasminogen. White 96-well microtiter plates (Greiner Bio One) were coated with 1 µg of C1q, plasminogen (Boehringer) or BSA as a control in 100 µl PBS at 4°C overnight. Saturation was performed by adding 200 µl of PBS–2% BSA per well for 1 h at RT. Five washes were performed using 200 µL of PBS. The recombinant Hsa and Spn GAPDHs were added in each well (amounts ranging from 10 ng to 10 µg) and the mixture was incubated for 2 h at RT. Five washes were performed using 200 µl of PBS–0.2% Tween. His-tagged bound Hsa and Spn GAPDH proteins were detected by adding 100 µl of horseradish peroxidase-conjugated anti-His antibody (Sigma) (1:1,000 dilution) in PBS–0.03% Tween 20–0.2% BSA per well for 1 h at RT. Four washes with 200 µl PBS–0.2% Tween 20 were performed. ECL solution (Pierce) (100 µl) was added to each well and chemiluminescence was measured using a multiwell luminescence reader (Fluostar Optima; BMG).

SPR measurements - Surface plasmon resonance (SPR) measurements were performed using a Biacore 3000 instrument (GE Healthcare). C1q and its globular regions (GR) were covalently immobilized to the dextran matrix of a CM5 sensor chip via the primary amine groups (amine coupling kit; GE Healthcare). The carboxymethylated dextran surface was activated by the injection of a mixture of 0.2 M *N*-ethyl-*N'*-(diethylamino-propyl)carbodiimide and 0.05 M *N*-hydroxysuccinimide. Ligands were injected in 10 mM sodium acetate buffer (pH 5.0). Ligand concentrations and contact time were adjusted according to the desired level of immobilization. The remaining *N*-hydroxysuccinimide esters were blocked by injection of 1 M ethanolamine hydrochloride (pH 8.5). All immobilization steps were performed at a flow rate of 10 µl/min in 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% P20 (GE Healthcare) (pH 7,4). Immobilization levels for C1q and GR were 19,752 RU and 9,933 RU, respectively. No protein was immobilized on the control flow cell that underwent the activation and blocking steps. Binding experiments were performed at 25°C at a flow rate of 30 µl/min in 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 0.005% P20 (pH 7,4). Spn GAPDH was injected at different concentrations ranging from 1 nM to 10 nM

and Hsa GAPDH at concentrations ranging from 5 nM to 50 nM. Data were double referenced by subtraction of the control flow cell signal and of a blank run (buffer only). In all experiments, association phases ran for 180 s and dissociation phases for 300 s. The surface was regenerated with pulses of guanidinium chloride ranging from 0.1 M up to 1 M. Data were analyzed by global fitting to a 1:1 Langmuir binding model of both the association and the dissociation phases for several concentrations simultaneously, using the BIAevaluation 3.2 software (BIAcore). In each case, the data presented were obtained with a statistic χ^2 value <2 . The apparent equilibrium dissociation constants (K_D) were calculated from the ratio of the dissociation and association rate constants (k_d/k_a).

Cross-linking experiments - Soluble interactions between Hsa or Spn GAPDH and C1q were checked using a cross-linking strategy. 10, 50 and 100 μ g of GAPDH proteins were incubated with or without C1q (50 μ g) in 50 μ l of 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂ (pH 7,4) for 1 h at 4°C. Glutaraldehyde was then added at the final concentration of 0.03% and the incubation was pursued for 1 h at 4°C. The cross-linking reaction was stopped by addition of 5 μ l of 1 M Tris-HCl (pH 8.0). The protein complexes were separated by SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane and analyzed by Western blot using horseradish peroxidase- conjugated anti-His antibody (1:5,000 dilution, Sigma Aldrich) and ECL (Pierce) as detection reagent.

Quantification of pneumococcal surface-exposed GAPDH - The amount of surface-exposed pneumococcal GAPDH was analyzed by an alkaline elution strategy. A 50-ml culture in late-exponential growth phase ($OD_{600} \approx 0.6$) was harvested by centrifugation (15 min, 3,000 x g). The bacterial culture density was also measured by CFU counting on blood-agar plates. The cells were resuspended in PBS to adjust the bacterial suspension to 1.5×10^9 , 3×10^9 , 7.5×10^9 , 1.5×10^{10} , 2.25×10^{10} and 3×10^{10} CFU in 100 μ l of 100 mM carbonate (pH 10) buffer and incubated for 30 min at 37°C. The suspensions were centrifuged, the supernatants collected, separated by SDS-PAGE, transferred on a nitrocellulose membrane and analyzed by Western blot using rabbit anti-pneumococcal GAPDH antibody (1:5,000 dilution), horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (1:5,000 dilution, Sigma Aldrich) and ECL (Pierce) as detection reagent. The intensity of the spots was quantified using the ImageJ software. The amount of GAPDH in each sample was determined related to the GAPDH released by the wild-type strain, used at the highest concentration, and this value was

arbitrarily considered as 100%. If necessary, the intensities values were adjusted based on the CFU counting.

Pneumococcal subcellular fractionation - The amount of pneumococcal GAPDH in the different cell compartments of the wild-type and HBt mutant strains was analyzed by cell fractionation. One tenth of a 100 ml culture in late-exponential growth phase ($OD_{600} \approx 0.6$) was centrifuged (15 min, 3,000 x g), the pellet was resuspended in 1 ml of PBS containing 100 $\mu\text{g/ml}$ lysozyme and 50 U/ml mutanolysin and incubated for 2 h at 37°C, leading to the whole cell lysate extract. The remaining 90 ml were centrifuged (15 min, 3,000 x g), the pellet was resuspended in 9 ml of PBS containing 100 $\mu\text{g/ml}$ lysozyme, 50 U/ml mutanolysin, 30% sucrose and incubated for 2 h at 37°C. This lysate was centrifuged and the supernatant containing the cell wall was collected. The pelleted protoplasts were resuspended in 9 ml of 10 mM HEPES, 10 mM KCl (pH 7,4), lysed by 3 cycles of freezing/thawing and ultracentrifuged for 45 min at 190,000 x g. The soluble cytoplasm was collected while the membrane pellet was resuspended in 9 ml of 10 mM HEPES, 10 mM KCl (pH 7,4). The different subcellular fractions were serially diluted, separated by SDS-PAGE, transferred on a nitrocellulose membrane and analysed by Western blot using rabbit anti-pneumococcal GAPDH antibody (1:5,000 dilution), horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (1:5,000 dilution, Sigma Aldrich) and ECL (Pierce) as detection reagent. The intensity of the spots was quantified using the ImageJ software.

Immunofluorescence microscopy - HeLa cells cultivated on glass coverslips were washed in PBS and fixed for 5 min with 4% paraformaldehyde, incubated with 1% BSA and then submitted to GAPDH and C1q detection by indirect immunofluorescence using a rabbit anti-C1q polyclonal antibody diluted 1:100 and a monoclonal anti-human GAPDH antibody diluted 1:250 in PBS. Bound antibodies were visualized with Cy3-conjugated goat anti-mouse IgG (JacksonImmunoResearch Laboratories) and Alexa 488-conjugated anti-rabbit IgG diluted 1:250 in PBS. Cells were mounted on glass slides with Vectashield mounting medium for fluorescence with 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Vector Laboratories). Cells were photographed using an epifluorescence Olympus IX81 microscope equipped with differential interference contrast (Nomarski) and a reproducible optical section acquisition system ($\Delta Z_{\text{min}} = 0.1 \mu\text{m}$) for 3D reconstruction. To assess spatial localizations within the cell and at the surface, serial optical sections were taken at 0.5 μm intervals throughout the thickness of all cells examined. Volocity 6 software was used for analysis and treatment

(deconvolution/restoration, colocalization, quantification). Pearson's correlation coefficient was measured on each view to reinforce colocalization observations. Coefficients ≥ 0.75 were measured for all images shown.

Wild-type R6 pneumococcal strain was grown at an OD₆₀₀ of 0.3 and fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min in ice. Cells were then deposited onto poly-L-lysine-coated Poly Prep slides (Sigma-Aldrich) and permeabilized in cold methanol for 5 min. Slides were blocked for 30 min at RT with 5% (w/v) nonfat dry milk in PBS (saturation buffer) and then incubated for 1 h with anti-pneumococcal GAPDH antibody in saturation buffer. The slides were then washed twice in PBS and incubated with a 1:300 dilution of Cy2-conjugated goat anti-rabbit antibody in saturation buffer. After successive washes with PBS and water, cells were incubated with 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI (TEBU) for 15 min or with 0.5 μl FM4-64 (1 mg/ml, Molecular Probes). Slides were mounted with Moviol and examined with an Olympus BX61 microscope equipped with an UPFLN 100x O-2PH/1.3 objective and a QImaging Retiga-SRV 1394 cooled charge-coupled device camera. Image acquisition was performed using Volocity 6 software without any further picture processing.

Bacterial binding assay - Solid-phase binding assays were performed to measure binding of the R6 and D39, wild-type and HBt strains, to C1q and plasminogen. Black 96-well microtiter plates (Greiner Bio One) were coated in triplicates with 1 μg of C1q, plasminogen or BSA in PBS at 4°C overnight. Saturation was performed by adding 200 μl of PBS-2% BSA per well for 1 h at RT. Five washes were performed using 200 μl of PBS. 100 μl of FITC-labeled bacterial suspensions (3×10^7 , 7.5×10^7 , 1.5×10^8 or 3×10^8 CFU/ml) were added to each well, and the mixture was incubated for 1 h at RT. Five washes were performed using 200 μl of PBS-0.2% Tween 20. The bacteria-associated fluorescence was measured using a multiwell fluorescence reader (Fluostar Optima, BMG). Bacterial suspensions of the wild-type and HBt mutant strains were plated for CFU counting to control the bacterial density. The data were corrected accordingly to the wild-type /HBt ratio: the binding level was related to the value displayed by the wild-type strain, used at the highest concentration, and arbitrarily considered as 100%.

Electron microscopy analysis - Isolated GAPDH and C1q samples at a concentration of approximately 0.05 mg/ml were applied to the clean side of carbon on mica (carbon/mica interface) and negatively stained with 2% ammonium molybdate (pH 7,4). A grid was placed on top of the carbon film, which was subsequently air-dried. Images were taken under low-

dose conditions with a CM12 Phillips electron microscope at 120 kV and a calibrated nominal magnification of 45 K using an ORIUS SC1000 CCD camera (GATAN Inc.). Glutaraldehyde cross-linked complexes were also analyzed by EM. In addition, the recently described GraFix sample preparation technique was also used to obtain cross-linked C1q-GAPDH complexes (38). Briefly, the complexes were prepared by incubation of a 2:1 ratio mixture of GAPDH (0.1 mg/ml) and C1q (0.05 mg/ml) in 10 mM HEPES, 150 mM NaCl 2 mM CaCl₂ (pH 7,4) at RT for 30 min. One hundred microliters mixture was applied to a 0.5 ml 20-40% (v/v) glycerol / 0.033-0.1% (v/v) glutaraldehyde gradient. After centrifugation at 20,000 rpm in an SW55Ti rotor (Beckman Coulter) for 18h at 4°C, 50 µl fractions were collected from the top of the gradient, and excess glutaraldehyde was inactivated by adding 5 µl 1 M Tris to each fraction. To remove the maximum of glycerol, the carbon/sample was rinsed by plunging it into buffer without glycerol. Staining with ammonium molybdate took place after this step.

C1 activation assay - C1 activation was assayed as described previously (35). Rapidly, C1q (0.25µM) and various amount of GAPDH were incubated 20 min at 37°C before addition of equimolar amounts of the C1s-C1r-C1r-C1s tetramer (0.25µM) to reconstitute the C1 complex. The mixture was then incubated 20 min at 37°C in 50 mM triethanolamine-HCl, 145 mM NaCl, and 2 mM CaCl₂ (pH 7,4). The reaction mixtures were submitted to SDS-PAGE analysis under reducing conditions using 10% acrylamide gels. The bands corresponding to C1s were revealed by Western blot analysis using a rabbit polyclonal antibody after electrotransfer to a nitrocellulose membrane. C1 activation was determined from the amounts of the A and B chains of activated C1s relative to that of the proenzyme. In a control experiment it was verified that GAPDH does not activate the C1s-C1r-C1r-C1s tetramer in the absence of C1q.

Complement deposition assay - Complement deposition upon treatment with human serum was measured as follow. White 96-well microtiter plates (Greiner Bio One) were coated in triplicates with 10x10⁶ R6 WT, D39 WT, R6 HBt or D39 HBt bacteria in 100 µL of 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, (pH 7,4) (HBS-C buffer) for 2 h at RT. Saturation was performed by adding 100 µL of HBS-C-0.2% gelatin per well for 1 h at RT. Human serum (100 µL, 1:25 dilution) or HBS-C (100 µL) was added in each well and incubated for 1 h 30 min at RT. C1q, C4b and C3b deposition was detected by adding 100 µl of anti-C1q, anti-C4 or anti-C3 antibody (1:1,000 dilution) in HBS-C-0.02% gelatin per well for 1 h at RT, followed by 100 µL of horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (1:1,000

dilution) in HBS-C-0.02% gelatin for 1 h at RT. ECL solution (Pierce) (100 μ l) was added to each well and chemiluminescence was measured using a multiwell luminescence reader (Fluostar Optima; BMG). Two washes were performed with 100 μ L of HBS-C between each step.

RESULTS

The human GAPDH exposed at the cell surface is a novel C1qGR-binding protein - GAPDH was initially detected by blot overlay on plasma membrane extracts using the C1q globular region as the bait (Fig. 1A). This experiment was designed to identify unknown cell surface C1q ligand(s) potentially involved in the recognition and the uptake of apoptotic cells by macrophages. When incubated with plasma membrane proteins extracted from viable and early apoptotic HeLa cells (triggered by UVB irradiation), biotinylated-C1qGR strongly revealed a 36 kDa-band, which intensity slightly increased with the development of apoptosis (Fig. 1A, lanes 2, 3 and 4 compared to lane 1). N-terminal protein sequencing analysis demonstrated unambiguously that this band corresponds to GAPDH (data not shown). Since GAPDH is a major and widely expressed protein in all human cells, complementary analyzes were conducted to validate this initial observation. The presence of GAPDH on the surface of HeLa cells was confirmed after cell surface biotinylation, purification of the biotinylated proteins using streptavidin magnetic beads and Western blotting using an antibody directed against human GAPDH (Fig. 1B). As expected, GAPDH is detected in the pellet (P) fraction containing biotinylated surface proteins. The supernatant (S) fractions correspond to the intracellular compartments in which GAPDH is present independently of the biotinylation procedure. Surface GAPDH expression was also investigated by flow cytometry on HeLa and Jurkat cells. The human monocyte THP-1 cell line was used as a control since it was published that macrophages express GAPDH at their surface (26). As shown in Figure 1C and D, all the cell lines expose GAPDH at their surface. Intriguingly, HeLa and Jurkat cells appeared to display two distinct populations (negative- or low expressing- and positive-populations for GAPDH surface expression). This unexpected result obtained with a monoclonal anti-human GAPDH antibody (Inen) was confirmed using a rabbit polyclonavitrogl anti-GAPDH antibody (Sigma) (data not shown). Since membrane- anchored GAPDH increased with apoptosis development (Fig. 1A), we analyzed the GAPDH cell surface exposure up to 4h after apoptosis induction (and before significant plasma membrane permeabilization) by FACS. As shown in Figure 1D a significant increase in the amount of surface-anchored GAPDH was detected on Jurkat cells. Finally, the GAPDH recognition by C1qGR was confirmed by pull down experiments on solubilized plasma membrane proteins using biotinylated C1qGRs as the bait (Fig. 1E, lane 6). No GAPDH detection was obtained in the absence of C1qGR (Fig. 1E, lane 2) or using biotin alone (Fig. 1E, lane 4). Unlabeled C1q competed efficiently for the binding of GAPDH to biotinylated C1q (not shown). All

together these results demonstrate that C1qGR binds to GAPDH present at the surface of human cells.

C1q and GAPDH co-localize at the surface of apoptotic cells - Based on the above observation, we questioned whether GAPDH could be a ligand of C1q involved in the recognition of apoptotic cells. To this end, co-localization experiments were conducted on viable and apoptotic HeLa cells, using either the globular region of C1q or the complete molecule. As illustrated in Fig. 2, GAPDH was detected at the cell surface on both viable and apoptotic HeLa cells (Fig. 2C, H, M and R), in agreement with the cytometry experiment (Fig. 1C). Binding of C1q was detected on apoptotic cells (Fig. 2S) and to a lesser extent on non-apoptotic cells (Fig. 2I), while C1qGR binding was mainly detected on apoptotic cells (Fig. 2N). The co-localization was supported by Pearson's correlation coefficients measured on the merged images shown in Fig. 2 (panels J, O and T), as described in *Experimental procedures*. In conclusion, C1q and C1qGR mostly co-localize with GAPDH detected on the surface of apoptotic cells characterized by plasma membrane blebbing. GAPDH-C1q co-localization is not restricted to HeLa cells since we obtained similar results on apoptotic Jurkat cells (not shown).

Expression and purification of human and pneumococcal GAPDH proteins - To further investigate the C1q binding to human and bacterial GAPDHs, comparable production strategies were conducted to produce human (Hsa) and pneumococcal (Spn) recombinant GAPDH proteins. The expression vectors used allowed production of the recombinant proteins fused to a histidine affinity tag. SDS-PAGE analysis of the purified recombinant proteins indicated that Hsa and Spn GAPDHs were essentially pure and exhibited apparent molecular weights of about 38 kDa under reducing conditions (data not shown) in accordance with the calculated and measured masses. Indeed, the molecular masses determined by MALDI-TOF analysis were $38,198 \pm 39$ Da and $38,193 \pm 9$ Da for Hsa and Spn GAPDH respectively, consistent with the values predicted from the amino acid sequences after removal of the N-terminal methionine (38,198 Da and 38,180 Da, respectively). Transmission electron microscopy confirmed the homogeneity of the preparation and the tetrameric oligomerization state of both Hsa and Spn GAPDHs (see Fig. 5) (39-42).

Pneumococcal and human GAPDHs interact with C1q in vitro - Spn and Hsa recombinant GAPDH proteins ranging from 0.01 μ g to 10 μ g were incubated with coated C1q. Significant

dose-dependent binding responses of both GAPDH proteins to C1q were observed when compared to BSA used as negative control (Fig. 3A). Similar results were obtained with coated plasminogen used as a positive control showing that human GAPDH, like its bacterial homolog, binds to plasminogen (Fig. 3B).

Human and pneumococcal GAPDHs bind to C1q globular region with high affinity - SPR experiments confirmed the interactions between GAPDH and C1q (Fig. 4). Interaction was first tested using two different human GAPDH proteins: a commercially available native form and a His-tagged recombinant form. We have compared the C1q and the globular regions of C1q (C1qGR) interaction with both immobilized human GAPDHs. In this configuration, the K_D values determined using the simple 1:1 interaction model showed no significant differences between the native and recombinant human GAPDH forms (K_D of 4×10^{-7} M and 3×10^{-7} M, respectively). In the reverse configuration with C1q immobilized on the sensor chip surface, binding of human and pneumococcal His-tagged recombinant GAPDH proteins was concentration-dependent (Fig. 4A and B). The data fit to the simple 1:1 interaction model proposed by the BIAevaluation software from which kinetic parameters have been calculated. However, due to oligomeric organizations of GAPDH (tetramer) and C1q (hexamer), the interaction likely results from global avidity recognition. Consequently, the K_D determinations correspond to apparent values (Table I). The GAPDH binding to C1q is of high affinity since apparent K_D values in the nanomolar range were determined for Spn and Hsa GAPDHs (0.34 nM and 2.17 nM, respectively). Comparison of the association and dissociation rate constant values indicates that the pneumococcal protein forms a slightly more stable complex with C1q than the human GAPDH (Table I). This effect was also observed using the reverse experimental configuration where the GAPDH proteins were immobilized and C1q used as the soluble analyte (data not shown). Both GAPDHs interacted with the C1qGR, even though the apparent affinity was higher for the pneumococcal protein (0.73 nM) when compared to the value obtained with the human form (4.40 nM) (Table 1) (Fig. 4C, D). As already observed with the whole molecule, the complex formed by Spn GAPDH and C1qGR is more stable than the one involving the human protein (Table I).

Pneumococcal and human GAPDHs form complexes with C1q in solution - Formation of the GAPDH-C1q complex in solution was analyzed by a cross-linking approach followed by Western blot detection (Fig. 5). Increasing quantities of GAPDH proteins were used (10, 50 and 100 μ g). The proteins migrate as monomeric forms in the absence of glutaraldehyde, with

an apparent molecular mass around 37 kDa, in accordance with the calculated masses (Fig. 5A, B). The migration pattern of the GAPDH proteins is not modified in the presence of C1q. Addition of glutaraldehyde induced the formation of dimers and multimers of human and pneumococcal GAPDHs (Fig. 5A, B). In these experimental conditions, pneumococcal GAPDH generated significantly more tetramers and oligomers (Fig. 5B). In the presence of C1q, cross-linking led to the appearance of species of high molecular weight range corresponding to the complex formed between GAPDH and C1q. Taking into account that both GAPDHs form oligomers and that the C1q molecule has a molecular weight of 460 kDa, it is likely that the covalent association of both partners is heterogeneous in size impairing determination of the stoichiometry of the complex.

Electron microscopy was used to further investigate the association between GAPDH and C1q. Purified recombinant human and pneumococcal GAPDHs harbor a tetrameric structure (Fig. 5C). Isolated C1q displays the classical hexameric structure resembling a bouquet of tulips (Fig. 5C). The top view clearly shows the six globular regions of the molecules organized around the stem. The Hsa GAPDH-C1q complex was deposited on electron microscopy grids directly after cross-linking experiment (Fig. 5D, right) or after the GraFix procedure (38), a sample preparation protocol combining the sedimentation of complexes through a glycerol gradient with mild chemical cross-linking (Fig. 5D, left). As shown on representative images corresponding to top views of C1q, complexes were clearly observed, since GAPDH molecules characterized by their tetrameric-like structure are localized to each of the globular regions of C1q. Similar images were obtained from samples from GraFix and classical cross-link experiments with human GAPDH. No difference was detected when comparing human and pneumococcal GAPDHs in complex with C1q.

Construction of S. pneumoniae strains with reduced level of surface-exposed GAPDH - The cellular localization of GAPDH was analyzed by immunofluorescence experiments. R6 *S. pneumoniae* was incubated with anti-GAPDH antibodies and with Cy2 conjugated secondary IgG. DNA and membranes were labeled with DAPI and FM4-64, respectively (Fig. 6A). Both merged images show that GAPDH is localized at the cell poles. Green GAPDH localization appears to be external to the red FM4-64 membrane labeling, which indicates that GAPDH is associated with the cell surface (Fig. 6A).

Testing the physiological role of pneumococcal surface GAPDH requires the construction of a mutant strain with no or limited amount of surface GAPDH. Due to its essential role in the bacterial metabolism, the construction of a pneumococcal strain deleted for the gene

encoding GAPDH would be lethal. To overcome this difficulty, we applied to *S. pneumoniae* the strategy developed in *S. pyogenes*, which consists in inhibiting the export of the protein (37). A hydrophobic tail is inserted at the 3' end of the *gapdh* gene in the genome, which will anchor the protein to the membrane, prevent the export and retain the enzymatic activity in the cytoplasm. The insertion of the hydrophobic tail has been performed in the R6 and D39 strains. The mutant strains are designed HBt for "hydrophobic tail". The localization and expression level of GAPDH in the wild-type and mutants strains were compared in the different cellular compartments of R6 and D39 strains (Fig. S1). We could demonstrate that GAPDH expression is comparable in total extracts of both wild-type and mutant strains. We calculated that the proportion of GAPDH associated with the membrane fraction in the R6 HBt strain is increased by 50% when compared to the wild-type. Conversely, 83% less GAPDH is associated with the cell wall fraction in the R6 HBt strain when compared to the wild-type. Similar data were obtained when comparing the wild-type and mutant D39 strains. Taken together, these results show that the fusion of a hydrophobic tail indeed reduces to about 50% the quantity of GAPDH at the pneumococcal surface.

A complementary procedure was developed to quantify the level of surface-exposed GAPDH. Bacterial suspensions prepared at increasing cell densities were treated by alkaline pH in order to release GAPDH from the bacterial surface. Presence of GAPDH in the supernatant samples was detected by Western blot (Fig. 6B, C). The quantity of eluted GAPDH was correlated to the increasing cell density used, from 1.5×10^9 to 3×10^{10} CFU. Quantification of the chemiluminescent signals was performed. The values were adjusted to the CFU counting for both strains and normalized to the highest concentrated wild-type sample, referred as the 100%. The mean difference between HBt mutant and wild-type strains has been calculated: the R6 HBt strain displays only 49% of the GAPDH normally expressed at the surface of the wild-type, and 43% in the case of the D39 HBt strain. These data are in accordance with the calculations based on the sub-cellular fractionation results (Fig. S1).

Native GAPDH exposed at the surface of the pneumococcus binds to C1q - The specific binding of FITC-labeled wild-type and mutant R6 and D39 strains to C1q were compared using a solid-phase assay (Fig. 7). Increasing the bacterial concentration of R6 strains led to a dose-dependent binding to C1q, which displays lower intensity in the case of the HBt mutant strain (Fig. 7A). Even though the mutant binding to C1q is decreased by 16% and 11% at 3×10^7 and 7.5×10^7 CFU/ml when compared to the parental strain, the R6 HBt binding to C1q is decreased by 64% and 56% when used at 1.5×10^8 and 3×10^8 CFU/ml (Fig. 7A). Similar

data were calculated from the analysis of R6 wild-type and HBt strains binding pattern to plasminogen (Fig 7B). These results are in accordance with the half-decreased level of GAPDH exposed at the surface of the mutant strains. The less important binding decrease harbored by the R6 HBt strain to plasminogen compared to the binding to C1q might be explained by the presence at the pneumococcal surface of others plasminogen receptors like enolase and CbpE (43,44). Similar data were obtained when comparing the wild-type and mutant D39 strains (Fig. 7C, D). C1q binding to the D39 HBt mutant, used at 3×10^7 , 7.5×10^7 , 1.5×10^8 and 3×10^8 CFU/ml ranges from 46% to 56% when compared to the binding level of the wild-type strain (Fig. 7C). As observed with the R6 strain, the binding of the D39 HBt strain to plasminogen is decreased when compared to the D39 parental strain, from 53% to 72% (Fig. 7D).

Hsa and Spn GAPDHs affect differently complement activation - In order to measure a possible effect of GAPDH on the complement cascade, we first assayed the capacity of both human and pneumococcal GAPDHs to modulate C1 activation in an *in vitro* complement activation assay. Spontaneous C1 activation measured in the absence of C1 inhibitor after 20 min incubation at 37°C was not significantly modified in the presence of Hsa GAPDH (Fig. 8A). In contrast, using the same molar ratio (GAPDH/C1,7:1), Spn GAPDH induced a significant increase of the C1 activation, reaching up to 1.3-fold increase compared to the control. This observation prompted us to analyze the effect of the pneumococcal GAPDH in the presence of serum using the pneumococcal R6 and the virulent clinical D39 strains. In this assay, wild-type and HBt (deficient for surface GAPDH) strains were incubated with normal human serum (NHS) and C1q, C3b and C4b depositions were measured. C1q, C3b and C4b deposition level on the R6 mutant strain was decreased by 40% when compared with the wild-type strain (Fig. 8B). The effect is even more marked for the capsulated D39 HBt strain reaching 90% decrease in C3b deposition when compared with control. These observations provide clear evidence that Spn GAPDH activates the complement classical pathway.

DISCUSSION

We provide the first evidence that the eukaryotic and bacterial GAPDHs exposed at the cells surface are ligands of C1q, a major recognition molecule of the complement system. This conclusion is based on the following concordant observations: 1) the membrane-anchored GAPDH on HeLa cells binds C1q through its globular regions (GR), 2) C1qGR and

GAPDH co-localize at the surface of apoptotic cells, 3) cell surface GAPDH exposure increases rapidly at early steps of apoptosis, 4) the pneumococcal and the human GAPDH proteins interact *in vitro* avidly with C1q through its GR, 5) pneumococcal strains deficient for GAPDH surface exposure display significantly decreased C1q binding and 6) pneumococcal GAPDH participates to the complement activation unlike human GAPDH.

The complement system provides a first line of immune defense and plays multiple and central roles, like recognition and elimination of foreign invaders as well as damaged self-cells, clearance of immune complexes, connection between innate and adaptive immunity and interaction with other host cascade systems, like the coagulation system. The classical complement pathway is triggered by C1q recognition of IgG and IgM targeting microbes or cells to eliminate, of microbial or eukaryotic surface moieties (LPS, PS, polysaccharides) and of the pentraxins CRP, PTX3 and SAP bound to targets (45). Interestingly, besides its role in activation of the complement cascade, C1q acts as a bridging molecule between apoptotic cell and APC like macrophages and DCs and furthermore, C1q influences the phagocyte immune “status” (8,9). Even though C1q is described as a pattern recognition molecule with the unique ability to sense an amazing variety of targets, very few proteins expressed at the surface of pathogens have been identified as C1q ligands. To our knowledge, the unique reported bacterial protein ligand of the globular domains of C1q is the OmpK36 porin of *K. pneumoniae* (45).

In *S. pneumoniae* immunity, the complement classical pathway is an important component of the response (17,18) and is activated by various innate immune mediators, including antibodies, CRP, SAP and SIGN-R1. Recently, the lectin pathway has also been reported as a critical part of the innate immune response to pneumococcal infection (20). Many interactions between *S. pneumoniae* proteins and complement molecules have been identified but are likely involved in complement system evasion since mainly complement regulators are recruited by the bacteria. PspC interacts with the complement inhibitor C4b-binding protein which interferes with the assembly of the C4bC2a C3 convertase; acquisition of C4BP by the pneumococcus thereby inhibits classical pathway activation (46). CbpA recruits the host regulator Factor H leading to immune protection and complement inhibition through the formation of a protective shield (47), and also binds to the C3 component of complement (48). The fact that human GAPDH might be involved in the apoptotic cell recognition by C1q raises the possibility of a novel bacterial subversion mechanism of the host immune system by exploiting a tolerating outcome.

Until mid-1990s, it was admitted that a protein translated from one gene displayed a unique function. Later on, a growing number of proteins were described to harbor several functions leading to the generic term of moonlighting proteins (49,50). This feature is encountered in eukaryotic and prokaryotic organisms and concerns highly conserved proteins involved in metabolic pathways or acting as molecular chaperones. In addition to multiple functions, multiple cellular localizations are associated with the moonlighting proteins, like surface exposition even though the secretion mechanism remains unknown (51). Most of the bacterial enzymes involved in the glycolytic pathway exert various roles in pathological processes like adhesion and invasion of host cells (32,51). The GAPDH is among the most frequent glycolytic/moonlighting protein associated with the cell surface of pathogenic microorganisms (51) and has been extensively studied for its property to bind to plasminogen (33,51-54).

Roles of GAPDH in bacterial immunity have also been reported. Group A streptococcus-exposed GAPDH recruits the complement C5a which further inhibits the recruitment of neutrophils and H₂O₂ production suggesting a role in immune system evasion (55). *S. agalactiae* GAPDH elicits B cells responses and induces production of the immunosuppressive cytokine IL-10, indicating that GAPDH modulates immune response in order to promote host colonization by Group B Streptococcus (30). These data suggest that the role of GAPDH, when exposed at the surface of bacterial pathogens, might favor infection and/or persistence of the pathogen in the host organism by counteracting immune defense mechanisms.

The comprehensive role of externalized GAPDH on eukaryotic cells and in particular on apoptotic cell surfaces is still misunderstood. In this study, we showed an increased level of membrane-associated and surface-exposed GAPDH as soon as 2 h post-apoptosis induction (Fig. 1A and D). GAPDH was also recovered from cell culture medium of viable cells and to a larger extent after the induction of apoptosis (data not shown). This data is supported by study indicating that glycolytic enzymes, such as GAPDH, enolase and triosephosphate isomerase, are early biomarkers of apoptosis (56). Consequently, the GAPDH recognition by C1q at the early steps of apoptosis could probably be linked to the uptake process of altered self-cells by phagocytes. An interesting aspect highlighted by this work concerns differential effects of human and pneumococcal GAPDHs on complement activation. Bacterial GAPDH activates the complement cascade through the classical pathway. However, the involvement of the lectin and/or the alternative pathways cannot be excluded at this stage. These data indicate that GAPDH is one of the bacterial ligands that lead to complement activation and to

the clearance of bacteria. These observations appear not consistent with previous reported roles of GAPDH in virulence processes and persistence of the bacteria in the host. This apparent paradox might be scrutinized in light of potential mimicry process with apoptotic cells considering that the surface-exposed and/or soluble GAPDH recognition by C1q could be a strategy displayed by the pneumococcus to evade the immune system in some specific step of the infection progression.

REFERENCES

1. Biro, A., Thielens, N. M., Cervenak, L., Prohaszka, Z., Fust, G., and Arlaud, G. J. (2007) Modified low density lipoproteins differentially bind and activate the C1 complex of complement. *Mol Immunol* **44**, 1169-1177
2. Biro, A., Ling, W. L., and Arlaud, G. J. (2010) Complement protein C1q recognizes enzymatically modified low-density lipoprotein through unesterified fatty acids generated by cholesterol esterase. *Biochemistry* **49**, 2167-2176
3. Blanquet-Grossard, F., Thielens, N. M., Vendrely, C., Jamin, M., and Arlaud, G. J. (2005) Complement protein C1q recognizes a conformationally modified form of the prion protein. *Biochemistry* **44**, 4349-4356
4. Klein, M. A., Kaeser, P. S., Schwarz, P., Weyd, H., Xenarios, I., Zinkernagel, R. M., Carroll, M. C., Verbeek, J. S., Botto, M., Walport, M. J., Molina, H., Kalinke, U., Acha-Orbea, H., and Aguzzi, A. (2001) Complement facilitates early prion pathogenesis. *Nat Med* **7**, 488-492
5. Korb, L. C., and Ahearn, J. M. (1997) C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited. *J Immunol* **158**, 4525-4528
6. Navratil, J. S., Watkins, S. C., Wisnieski, J. J., and Ahearn, J. M. (2001) The globular heads of C1q specifically recognize surface blebs of apoptotic vascular endothelial cells. *J Immunol* **166**, 3231-3239
7. Fraser, D. A., Pisalyaput, K., and Tenner, A. J. (2010) C1q enhances microglial clearance of apoptotic neurons and neuronal blebs, and modulates subsequent inflammatory cytokine production. *J Neurochem* **112**, 733-743
8. Fraser, D. A., Laust, A. K., Nelson, E. L., and Tenner, A. J. (2009) C1q differentially modulates phagocytosis and cytokine responses during ingestion of apoptotic cells by human monocytes, macrophages, and dendritic cells. *J Immunol* **183**, 6175-6185
9. Castellano, G., Woltman, A. M., Schlagwein, N., Xu, W., Schena, F. P., Daha, M. R., and van Kooten, C. (2007) Immune modulation of human dendritic cells by complement. *Eur J Immunol* **37**, 2803-2811
10. Paidassi, H., Tacnet-Delorme, P., Lunardi, T., Arlaud, G. J., Thielens, N. M., and Frchet, P. (2008) The lectin-like activity of human C1q and its implication in DNA and apoptotic cell recognition. *FEBS Lett* **582**, 3111-3116
11. Paidassi, H., Tacnet-Delorme, P., Garlatti, V., Darnault, C., Ghebrehwet, B., Gaboriaud, C., Arlaud, G. J., and Frchet, P. (2008) C1q binds phosphatidylserine and

- likely acts as a multiligand-bridging molecule in apoptotic cell recognition. *Journal of Immunology* **180**, 2329-2338
12. Paidassi, H., Tacnet-Delorme, P., Garlatti, V., Darnault, C., Ghebrehiwet, B., Gaboriaud, C., Arlaud, G. J., and Frachet, P. (2007) C1q binds phosphatidylserine and likely acts as an early bridging molecule in apoptotic cell recognition and clearance. *Mol Immunol* **44**, 178
 13. Elward, K., Griffiths, M., Mizuno, M., Harris, C. L., Neal, J. W., Morgan, B. P., and Gasque, P. (2005) CD46 plays a key role in tailoring innate immune recognition of apoptotic and necrotic cells. *J Biol Chem* **280**, 36342-36354
 14. Paidassi, H., Tacnet-Delorme, P., Verneret, M., Gaboriaud, C., Houen, G., Duus, K., Ling, W. L., Arlaud, G. J., and Frachet, P. (2011) Investigations on the C1q-Calreticulin-Phosphatidylserine Interactions Yield New Insights into Apoptotic Cell Recognition. *J Mol Biol*
 15. Martin, M., Leffler, J., and Blom, A. M. (2012) Annexin A2 and A5 serve as new ligands for C1Q on apoptotic cells. *J Biol Chem* **287**, 33733-33744
 16. O'Brien, K. L., Wolfson, L. J., Watt, J. P., Henkle, E., Deloria-Knoll, M., McCall, N., Lee, E., Mulholland, K., Levine, O. S., and Cherian, T. (2009) Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet* **374**, 893-902
 17. Yuste, J., Botto, M., Bottoms, S. E., and Brown, J. S. (2007) Serum amyloid P aids complement-mediated immunity to *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathog* **3**, 1208-1219
 18. Brown, J. S., Hussell, T., Gilliland, S. M., Holden, D. W., Paton, J. C., Ehrenstein, M. R., Walport, M. J., and Botto, M. (2002) The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 16969-16974
 19. Yuste, J., Sen, A., Truedsson, L., Jonsson, G., Tay, L. S., Hyams, C., Baxendale, H. E., Goldblatt, F., Botto, M., and Brown, J. S. (2008) Impaired opsonization with C3b and phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae* in sera from subjects with defects in the classical complement pathway. *Infect Immun* **76**, 3761-3770
 20. Ali, Y. M., Lynch, N. J., Haleem, K. S., Fujita, T., Endo, Y., Hansen, S., Holmskov, U., Takahashi, K., Stahl, G. L., Dudler, T., Giriya, U. V., Wallis, R., Kadioglu, A., Stover, C. M., Andrew, P. W., and Schwaebler, W. J. (2012) The lectin pathway of

- complement activation is a critical component of the innate immune response to pneumococcal infection. *PLoS Pathog* **8**, e1002793
21. Kang, Y. S., Do, Y., Lee, H. K., Park, S. H., Cheong, C., Lynch, R. M., Loeffler, J. M., Steinman, R. M., and Park, C. G. (2006) A dominant complement fixation pathway for pneumococcal polysaccharides initiated by SIGN-R1 interacting with C1q. *Cell* **125**, 47-58
 22. Sawa, A., Khan, A. A., Hester, L. D., and Snyder, S. H. (1997) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: nuclear translocation participates in neuronal and nonneuronal cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 11669-11674
 23. Sirover, M. A. (1997) Role of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in normal cell function and in cell pathology. *J Cell Biochem* **66**, 133-140
 24. Laschet, J. J., Minier, F., Kurcewicz, I., Bureau, M. H., Trottier, S., Jeanneteau, F., Griffon, N., Samyn, B., Van Beeumen, J., Louvel, J., Sokoloff, P., and Pumain, R. (2004) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a GABAA receptor kinase linking glycolysis to neuronal inhibition. *J Neurosci* **24**, 7614-7622
 25. Tarze, A., Deniaud, A., Le Bras, M., Maillier, E., Molle, D., Larochette, N., Zamzami, N., Jan, G., Kroemer, G., and Brenner, C. (2007) GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization. *Oncogene* **26**, 2606-2620
 26. Raje, C. I., Kumar, S., Harle, A., Nanda, J. S., and Raje, M. (2007) The macrophage cell surface glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a novel transferrin receptor. *J Biol Chem* **282**, 3252-3261
 27. Pancholi, V. (2001) Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cell Mol Life Sci* **58**, 902-920
 28. Pancholi, V., and Chhatwal, G. S. (2003) Housekeeping enzymes as virulence factors for pathogens. *Int J Med Microbiol* **293**, 391-401
 29. Matta, S. K., Agarwal, S., and Bhatnagar, R. (2010) Surface localized and extracellular Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Bacillus anthracis* is a plasminogen binding protein. *Biochim Biophys Acta* **1804**, 2111-2120
 30. Madureira, P., Baptista, M., Vieira, M., Magalhaes, V., Camelo, A., Oliveira, L., Ribeiro, A., Tavares, D., Trieu-Cuot, P., Vilanova, M., and Ferreira, P. (2007) *Streptococcus agalactiae* GAPDH is a virulence-associated immunomodulatory protein. *J Immunol* **178**, 1379-1387

31. Jin, H., Agarwal, S., and Pancholi, V. (2011) Surface export of GAPDH/SDH, a glycolytic enzyme, is essential for *Streptococcus pyogenes* virulence. *MBio* **2**, e00068-00011
32. Henderson, B., and Martin, A. (2011) Bacterial virulence in the moonlight: multitasking bacterial moonlighting proteins are virulence determinants in infectious disease. *Infect Immun* **79**, 3476-3491
33. Bergmann, S., Rohde, M., and Hammerschmidt, S. (2004) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus pneumoniae* is a surface-displayed plasminogen-binding protein. *Infect Immun* **72**, 2416-2419
34. Attali, C., Durmort, C., Vernet, T., and Di Guilmi, A. M. (2008) The interaction of *Streptococcus pneumoniae* with plasmin mediates transmigration across endothelial and epithelial monolayers by intercellular junction cleavage. *Infect Immun* **76**, 5350-5356
35. Bergmann, S., Rohde, M., Preissner, K. T., and Hammerschmidt, S. (2005) The nine residue plasminogen-binding motif of the pneumococcal enolase is the major cofactor of plasmin-mediated degradation of extracellular matrix, dissolution of fibrin and transmigration. *Thromb Haemost* **94**, 304-311
36. Tacnet-Delorme, P., Chevallier, S., and Arlaud, G. J. (2001) Beta-amyloid fibrils activate the C1 complex of complement under physiological conditions: evidence for a binding site for A beta on the C1q globular regions. *J Immunol* **167**, 6374-6381
37. Boel, G., Jin, H., and Pancholi, V. (2005) Inhibition of cell surface export of group A streptococcal anchorless surface dehydrogenase affects bacterial adherence and antiphagocytic properties. *Infect Immun* **73**, 6237-6248
38. Kastner, B., Fischer, N., Golas, M. M., Sander, B., Dube, P., Boehringer, D., Hartmuth, K., Deckert, J., Hauer, F., Wolf, E., Uchtenhagen, H., Urlaub, H., Herzog, F., Peters, J. M., Poerschke, D., Luhrmann, R., and Stark, H. (2008) GraFix: sample preparation for single-particle electron cryomicroscopy. *Nat Methods* **5**, 53-55
39. Vellieux, F. M., Hajdu, J., and Hol, W. G. (1995) Refined 3.2 Å structure of glycosomal holo glyceraldehyde phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma brucei*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **51**, 575-589
40. Ferreira-da-Silva, F., Pereira, P. J., Gales, L., Roessle, M., Svergun, D. I., Moradas-Ferreira, P., and Damas, A. M. (2006) The crystal and solution structures of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase reveal different quaternary structures. *J Biol Chem* **281**, 33433-33440

41. Jia, B., Linh le, T., Lee, S., Pham, B. P., Liu, J., Pan, H., Zhang, S., and Cheong, G. W. (2011) Biochemical characterization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Thermococcus kodakarensis* KOD1. *Extremophiles* **15**, 337-346
42. Mouche, F., Gontero, B., Callebaut, I., Mornon, J. P., and Boisset, N. (2002) Striking conformational change suspected within the phosphoribulokinase dimer induced by interaction with GAPDH. *J Biol Chem* **277**, 6743-6749
43. Bergmann, S., Wild, D., Diekmann, O., Frank, R., Bracht, D., Chhatwal, G. S., and Hammerschmidt, S. (2003) Identification of a novel plasmin(ogen)-binding motif in surface displayed alpha-enolase of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **49**, 411-423
44. Attali, C., Frolet, C., Durmort, C., Offant, J., Vernet, T., and Di Guilmi, A. M. (2008) *Streptococcus pneumoniae* choline-binding protein E interaction with plasminogen/plasmin stimulates migration across the extracellular matrix. *Infect Immun* **76**, 466-476
45. Kojouharova, M., Reid, K., and Gadjeva, M. (2010) New insights into the molecular mechanisms of classical complement activation. *Mol Immunol* **47**, 2154-2160
46. Dieudonne-Vatran, A., Krentz, S., Blom, A. M., Meri, S., Henriques-Normark, B., Riesbeck, K., and Albiger, B. (2009) Clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* bind the complement inhibitor C4b-binding protein in a PspC allele-dependent fashion. *J Immunol* **182**, 7865-7877
47. Lu, L., Ma, Z., Jokiranta, T. S., Whitney, A. R., DeLeo, F. R., and Zhang, J. R. (2008) Species-specific interaction of *Streptococcus pneumoniae* with human complement factor H. *J Immunol* **181**, 7138-7146
48. Smith, B. L., and Hostetter, M. K. (2000) C3 as substrate for adhesion of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* **182**, 497-508
49. Jeffery, C. J. (2009) Moonlighting proteins--an update. *Mol Biosyst* **5**, 345-350
50. Jeffery, C. J. (1999) Moonlighting proteins. *Trends Biochem Sci* **24**, 8-11
51. Henderson, B., and Martin, A. (2011) Bacterial Moonlighting Proteins and Bacterial Virulence. *Curr Top Microbiol Immunol*
52. Pancholi, V., and Fischetti, V. A. (1992) A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. *J Exp Med* **176**, 415-426
53. Egea, L., Aguilera, L., Gimenez, R., Sorolla, M. A., Aguilar, J., Badia, J., and Baldoma, L. (2007) Role of secreted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in

- the infection mechanism of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: interaction of the extracellular enzyme with human plasminogen and fibrinogen. *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 1190-1203
54. Jin, H., Song, Y. P., Boel, G., Kochar, J., and Pancholi, V. (2005) Group A streptococcal surface GAPDH, SDH, recognizes uPAR/CD87 as its receptor on the human pharyngeal cell and mediates bacterial adherence to host cells. *J Mol Biol* **350**, 27-41
55. Terao, Y., Yamaguchi, M., Hamada, S., and Kawabata, S. (2006) Multifunctional glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus pyogenes* is essential for evasion from neutrophils. *J Biol Chem* **281**, 14215-14223
56. Ucker, D. S., Jain, M. R., Pattabiraman, G., Palasiewicz, K., Birge, R. B., and Li, H. (2012) Externalized glycolytic enzymes are novel, conserved, and early biomarkers of apoptosis. *J Biol Chem* **287**, 10325-10343

Acknowledgments - We thank Isabelle Bally, Luca Signor and Izabel Bérard, Françoise Lacroix and Jean-Philippe Kleman from the IBS platform of the Partnership for Structural Biology and the Institut de Biologie Structurale in Grenoble (PSB/IBS) for assistance and access to the BIAcore, mass spectrometry and epifluorescence microscope facilities, respectively. We thank Sarah Ancelet for purification of C1q and its GR. We are grateful to Gérard Arlaud for his support at the beginning of this work.

FOOTNOTES

R.T. was supported by a PhD grant from the Rhône-Alpes region, Cluster Infectiologie. This work was partly supported by EC grant LSHM-CT-2004-512138 and ANR grants PneumoPG and ANR-09-PIRIBIO. This study was also supported by a grant from University Joseph Fourier-Grenoble (P.F.).

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. Human GAPDH is a ligand of the C1q globular region.

(A) Protein overlay of membrane extracts of viable (lane 1) and apoptotic (2, 4 and 6 h post-UV irradiation, lanes 2, 3 and 4) HeLa cells, using biotinylated-C1qGR as a probe. The arrow points a band with increasing intensity, identified as GAPDH. (B) GAPDH detection by Western blotting among biotinylated-HeLa cell surface proteins. GAPDH is detected in the pellet containing biotinylated surface proteins linked to beads (P). The control (Ct) with non-biotinylated cells is shown. The supernatants (S) correspond to the intracellular non-biotinylated proteins. (C and D) Non-permeabilized HeLa, THP-1 and Jurkat cells were stained with anti-GAPDH or with an isotype control and analyzed by FACS. Viable and early apoptotic Jurkat cells were shown (D). FL1-H corresponds to the FITC-fluorescence intensity. (E) GAPDH pull-down experiment on plasma membrane extracts using biotinylated C1qGR as the bait. GAPDH is only detected in the pellet (P) in the presence of C1qGR. (Biot) corresponds to pull down assay using free biotin. Supernatants of all pull-down conditions are shown. (Ct) corresponds to purified GAPDH. The positions of molecular mass markers (expressed in kilodaltons) are shown (A, B and E).

FIGURE 2. GAPDH and C1qGR co-localize on apoptotic plasma membrane blebs.

Cells were submitted to a double immunofluorescent labeling for GAPDH (red) and C1q or C1qGR (green) as described in *Experimental procedures*. Nuclei were labeled with Hoechst (blue). In merged views co-localization appears in yellow. A-J, Untreated control HeLa cells. K-T, apoptotic cells (6 h post-UV irradiation). A, F, K and P, differential interference contrast. C, H, M and R, surface GAPDH. D, I, N and S, C1q or C1qGR as specified. E, J, O and T, merge views. Scale bar represents 10 μm .

FIGURE 3. Binding of soluble pneumococcal and human GAPDHs to immobilized C1q and plasminogen by solid-phase assay.

Different quantities of His-tagged GAPDH, from 0.01 μg to 10 μg , were incubated for 1 h on 1 μg of proteins (BSA, C1q and plasminogen) coated on 96-well plate (corresponding respectively to 14.4, 2.12 and 11 pmol of proteins per well). Bound GAPDH proteins were detected by chemiluminescence reading (light measured between 240 and 740 nm) after

extensive washes and incubation with horseradish peroxidase-conjugated anti-His antibody. Results are given in an arbitrary units (AU). This assay was performed three times in triplicate wells. The average of three independent experiments \pm S.D. is shown. (A) pneumococcal and human GAPDH interaction with C1q. (B) pneumococcal and human GAPDH interaction with plasminogen. White bars correspond to coated BSA in A and B.

FIGURE 4. SPR measurements of pneumococcal and human GAPDH proteins interaction with C1q and its GR.

Binding of pneumococcal GAPDH (A) or human GAPDH (B) to C1q. Binding of pneumococcal GAPDH (C) or human GAPDH (D) to C1qGR. C1q and GR proteins were immobilized on a Biacore CM5 sensor chip, GAPDH recombinant proteins were the analytes. Data represent overlays of sensorgrams resulting from the injection of different concentrations of GAPDH as indicated. The blank run was subtracted from each sensorgram. Fits are shown as dotted lines and were obtained by global fitting of the data using a 1:1 Langmuir binding model. The kinetic parameters of the interactions determined by recording sensorgrams at varying GAPDH concentrations are listed in Table I.

FIGURE 5. Cross-linked complexes of pneumococcal and human GAPDH proteins with C1q.

Different quantities of human (A) and pneumococcal (B) GAPDH proteins were used (10, 50 and 100 μ g) and 50 μ g of C1q. Glutaraldehyde was added at the final concentration of 0.03%. The reactions were performed for 1 h on ice before loading on a 12.5% SDS-PAGE. An anti-His mouse monoclonal antibody was used for Western blot detection of the His-tagged GAPDH proteins. The molecular mass markers are indicated on the left side of each blot. (C) Electron micrographs of isolated GAPDHs and C1q. (D) Selected top views of complexes of both proteins obtained after classical cross-link or GraFix as specified. Samples were prepared as described under *Experimental procedures*. Hsa, human and Spn, pneumococcal.

FIGURE 6. Inhibition of surface-exposed GAPDH in mutant pneumococcal strains.

(A) Immunofluorescence localization of GAPDH in *S. pneumoniae* R6 strain. Bacteria grown to exponential phase ($OD_{600} \approx 0.3$) were deposited on slides, fixed, and incubated with rabbit polyclonal antibodies directed against pneumococcal GAPDH. Samples were then revealed with a secondary antibody coupled to Cy2. The bacterial chromosome was stained with DAPI and the membrane with FM4-64. (B, C) Quantification of pneumococcal GAPDH associated

with the bacterial surface in wild-type and mutant strains. Bacterial suspensions of the R6 and D39 wild-type and mutant strains were prepared at increasing cell densities CFU as indicated below each histogram and each of them was treated by alkaline pH in order to release GAPDH from the bacterial surface. Presence of GAPDH in the supernatant sample was detected by Western blot and quantification of the chemiluminescent signals was performed. The ratios were calculated in respect of the parental strain maximal concentration (3×10^{10} CFU as 100%). The average of the three independent experiments is shown \pm S.D. (B) R6 wild-type and HBt mutant strains. (C) D39 wild-type and HBt mutant strains.

FIGURE 7. Binding of pneumococcal R6 and D39 strains on C1q and plasminogen.

FITC-labeled bacteria at indicated concentration in CFU/ml were incubated for 1 h at RT on 1 μ g of proteins (C1q, plasminogen and BSA) coated on 96-well plate. After five washes, the fluorescence of FITC was measured. All experiment points were triplicates in each single assay. The average of three independent experiments \pm S.D. is shown. The ratios were calculated in respect of the parental strain maximal value. (A) R6 wild-type and HBt mutant strains binding to C1q. (B) R6 wild-type and HBt mutant strains binding to plasminogen. (C) D39 wild-type and HBt mutant strains binding to C1q. (D) D39 wild-type and HBt mutant strains binding to plasminogen. Background corresponding to the binding to BSA is subtracted for all points.

FIGURE 8. Effect of GAPDH on complement activation.

(A) *In vitro* activation of the C1 complex (0.25 μ M) in the presence of human or pneumococcal GAPDHs. C1 activation was monitored by Western blot analysis as described *in experimental procedures*. (B) C1q, C3b and C4b deposition measured in the presence of normal human serum (NHS) using anti-C1q, anti-C3 and anti-C4 antibodies on wild type R6 and D39 and R6 HBt and D39 HBt strains (partially deficient for surface GAPDH). Results are expressed relative to the signal obtained with the wild-type R6 or D39 strains, respectively. The data shown represent the mean value \pm SD of four (R6) or two (D39) independent experiments. Each experiment was done in triplicate. * Significance was determined by one-way ANOVA probability $P \leq 0.05$.

Table I. Kinetics and dissociation constants for the interaction between human and pneumococcal GAPDH and C1q or its isolated globular region (GR).

| Soluble analyte | Immobilized ligand | | | |
|---------------------|-------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|
| | GAPDH ^a | C1q | | GR |
| Pneumococcal | | | | |
| K_D (M) | 0.34 x 10⁻⁹ | \pm 0.04 x 10⁻⁹ | 0.73 x 10⁻⁹ | \pm 0.21 x 10⁻⁹ |
| Chi ² | 0.59 | \pm 0.28 | 0.33 | \pm 0.15 |
| k_a (1/Ms) | 6.51 x 10 ⁵ | \pm 4.42 x 10 ⁴ | 7.92 x 10 ⁵ | \pm 1.32 x 10 ⁴ |
| k_d (1/s) | 2.23 x 10 ⁻⁴ | \pm 4.29 x 10 ⁻⁵ | 5.47 x 10 ⁻⁴ | \pm 8.62 x 10 ⁻⁵ |
| Human | | | | |
| K_D (M) | 2.17 x 10⁻⁹ | \pm 0.14 x 10⁻⁹ | 4.40 x 10⁻⁹ | \pm 1.32 x 10⁻⁹ |
| Chi ² | 1.48 | \pm 0.19 | 0.79 | \pm 0.01 |
| k_a (1/Ms) | 3.16 x 10 ⁵ | \pm 3.42 x 10 ⁴ | 3.22 x 10 ⁵ | \pm 9.29 x 10 ⁴ |
| k_d (1/s) | 6.80 x 10 ⁻⁴ | \pm 2.67 x 10 ⁻⁵ | 1.25 x 10 ⁻³ | \pm 2.22 x 10 ⁻⁵ |

^aBinding of pneumococcal (1-10 nM) and human (5-50 nM) GAPDH was measured as described under *Experimental procedures*. The association (k_a) and dissociation (k_d) rate constants were determined using a 1:1 Langmuir binding model. The values shown are the means of at least three separate experiments \pm S.D.

FIGURE 1.

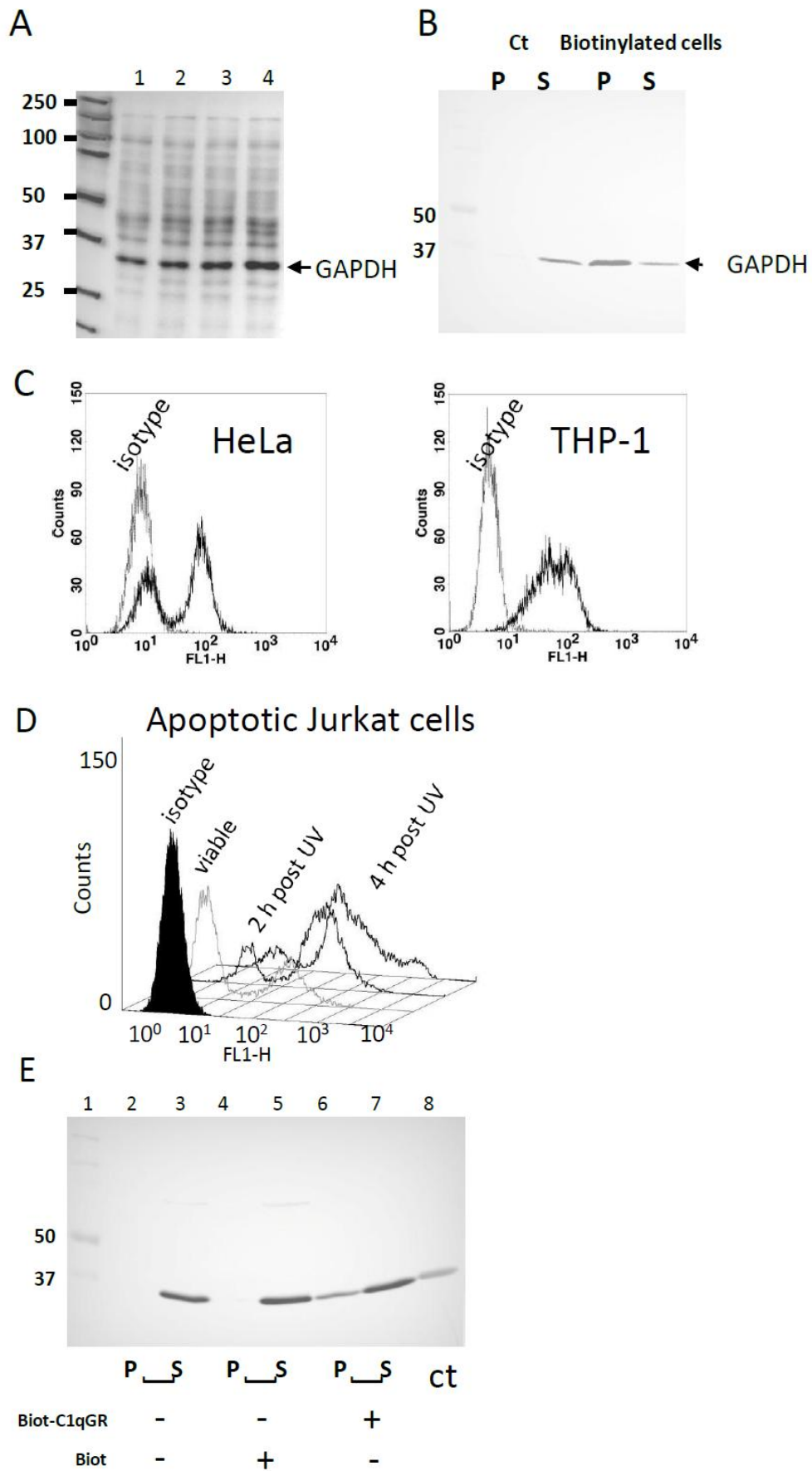


FIGURE 2.

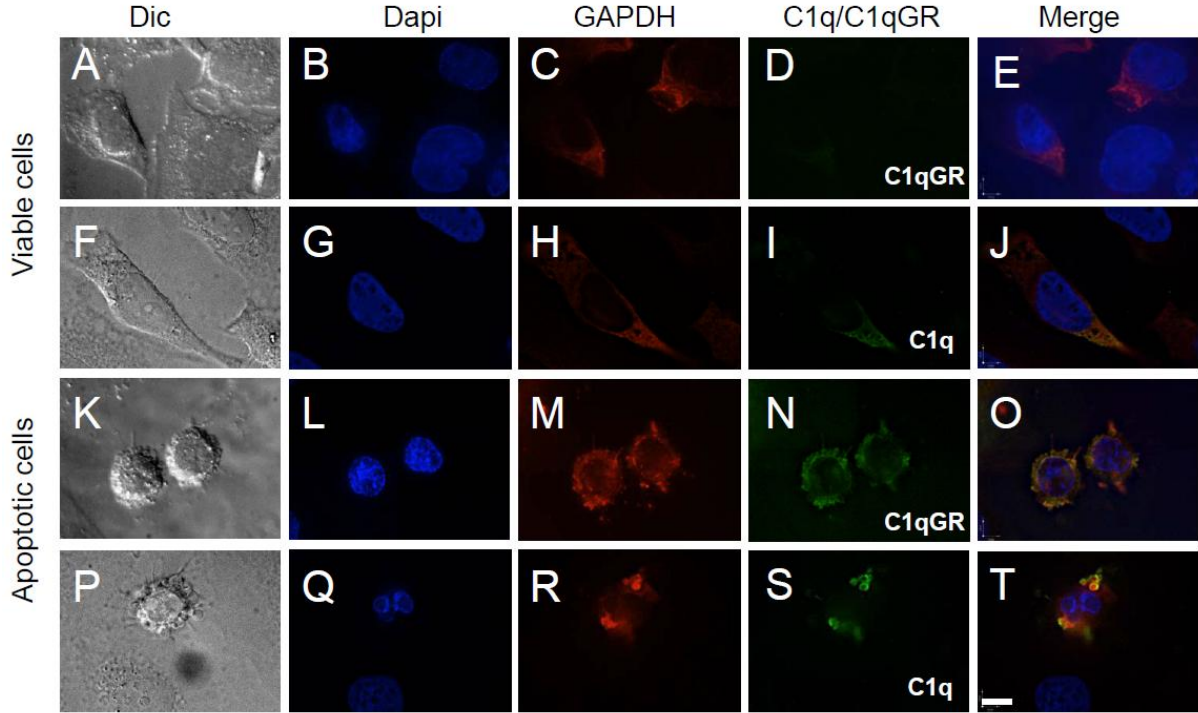
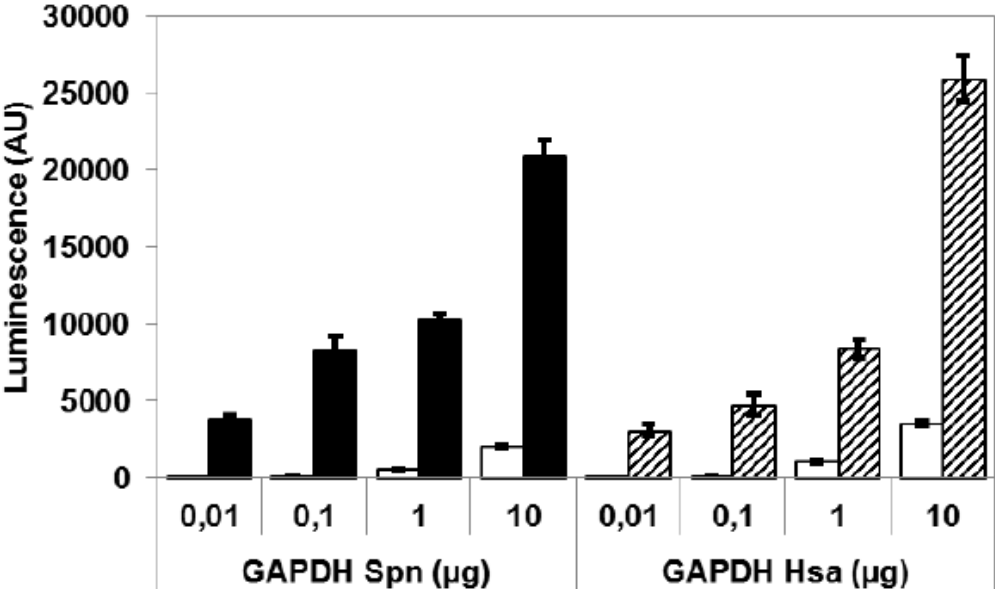


FIGURE 3.

A



B

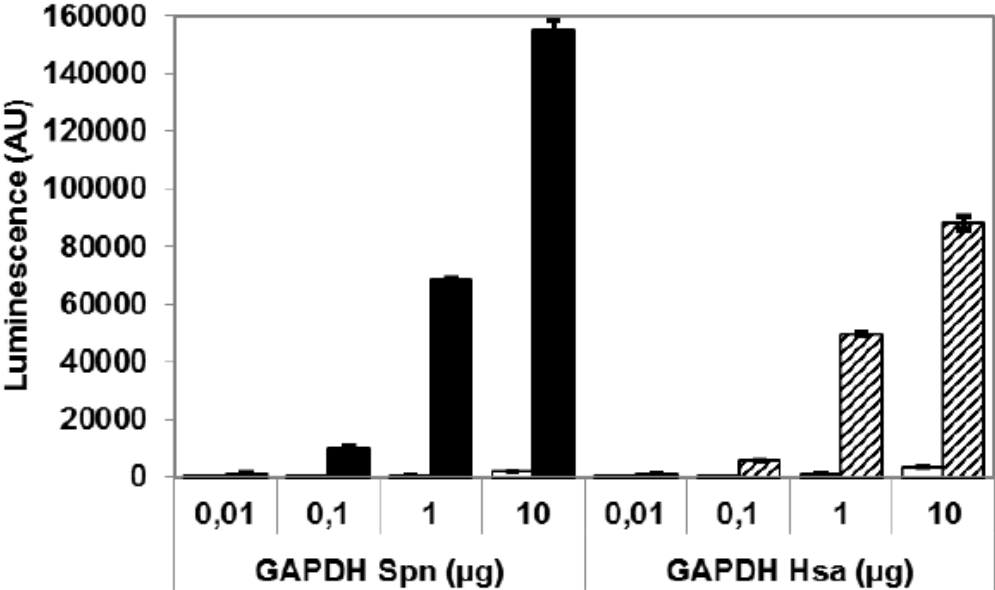


FIGURE 4.

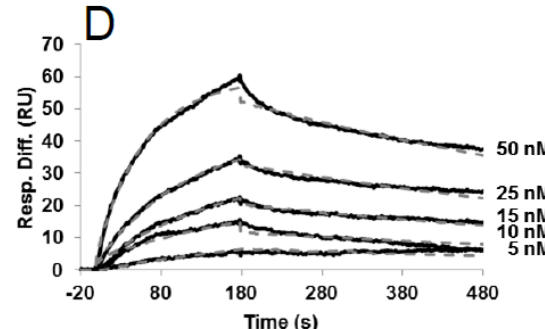
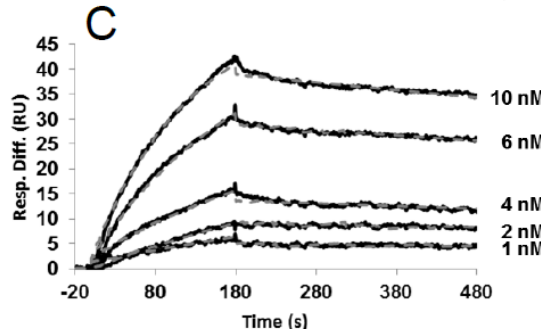
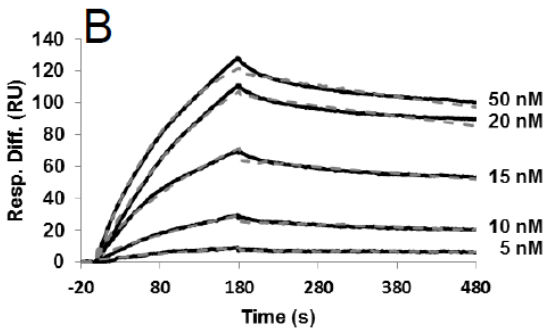
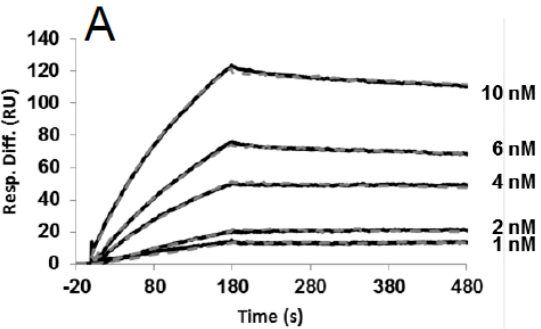
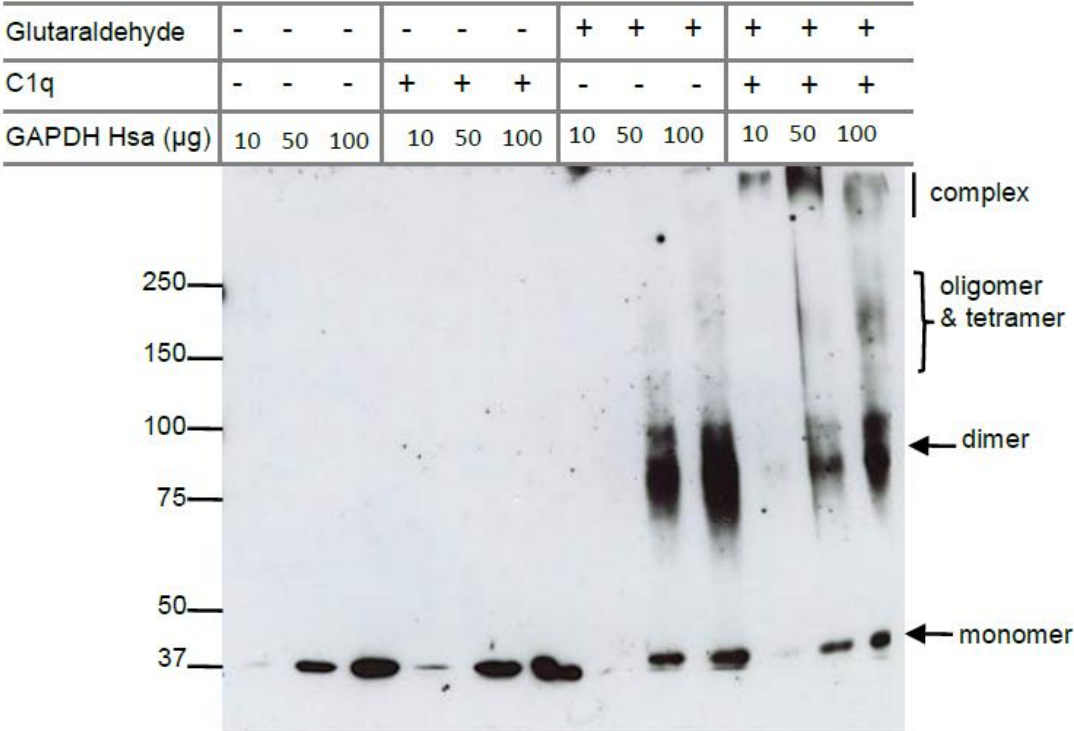
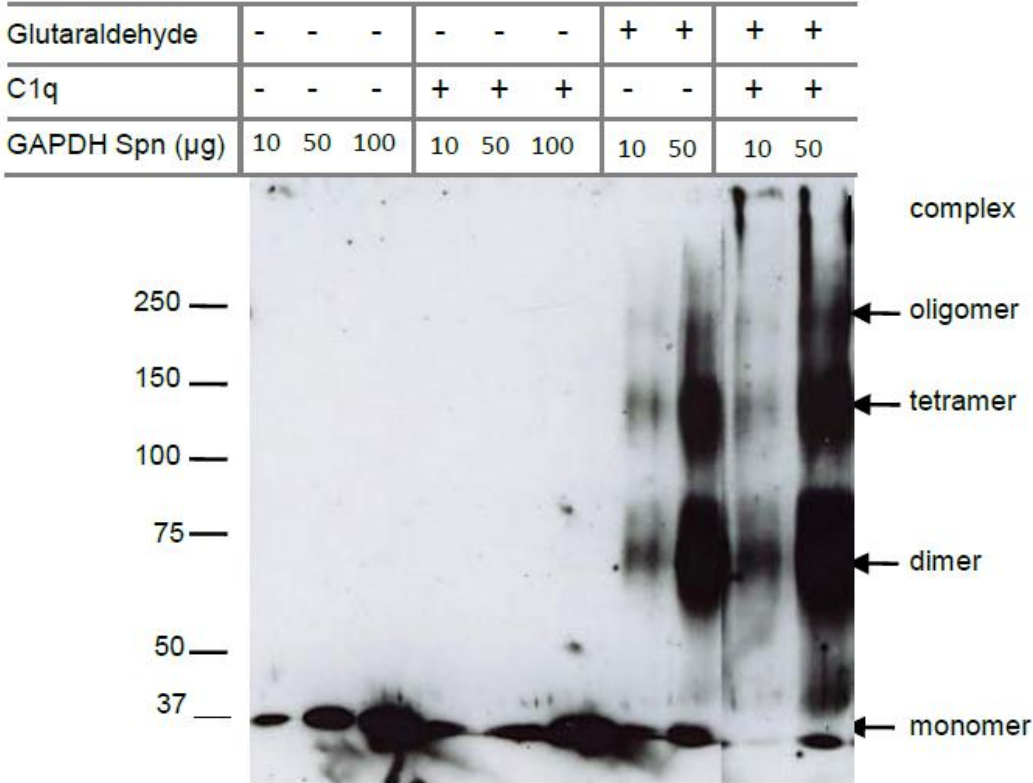


FIGURE 5.

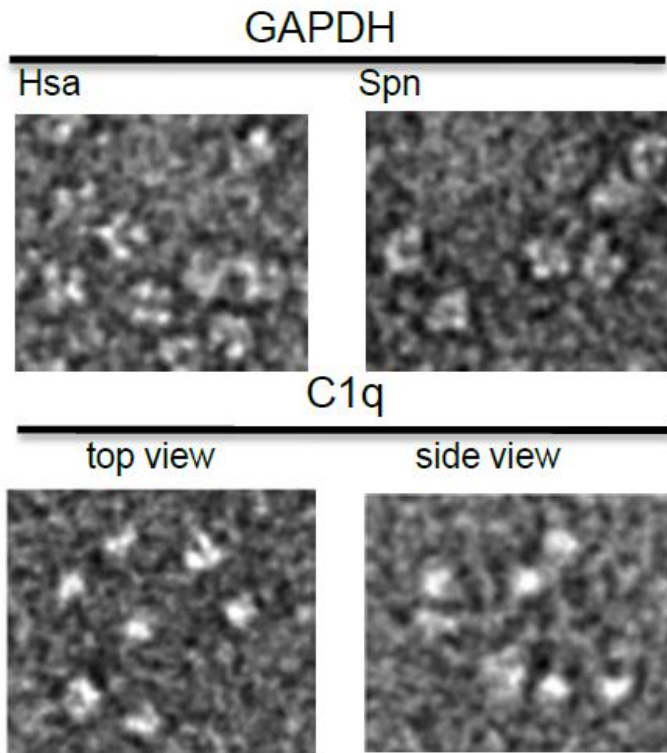
A



B



C



D

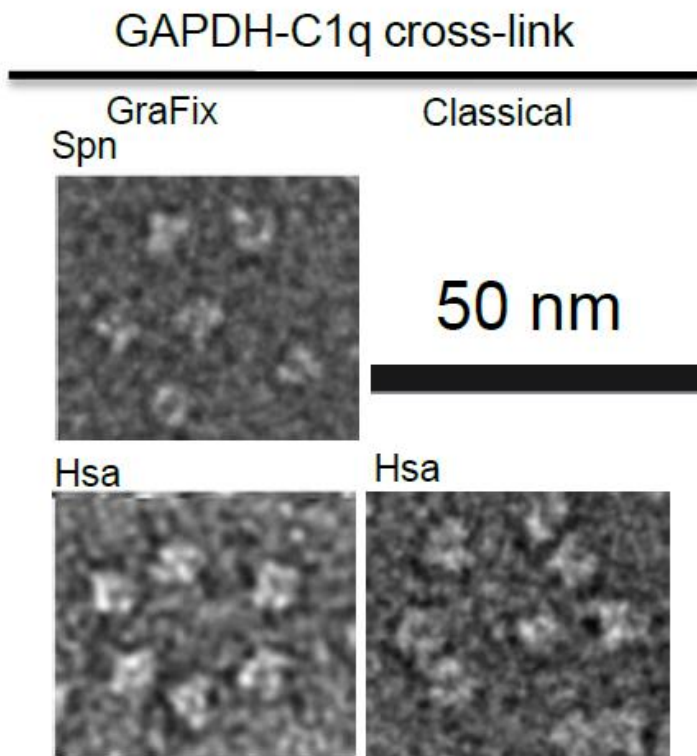
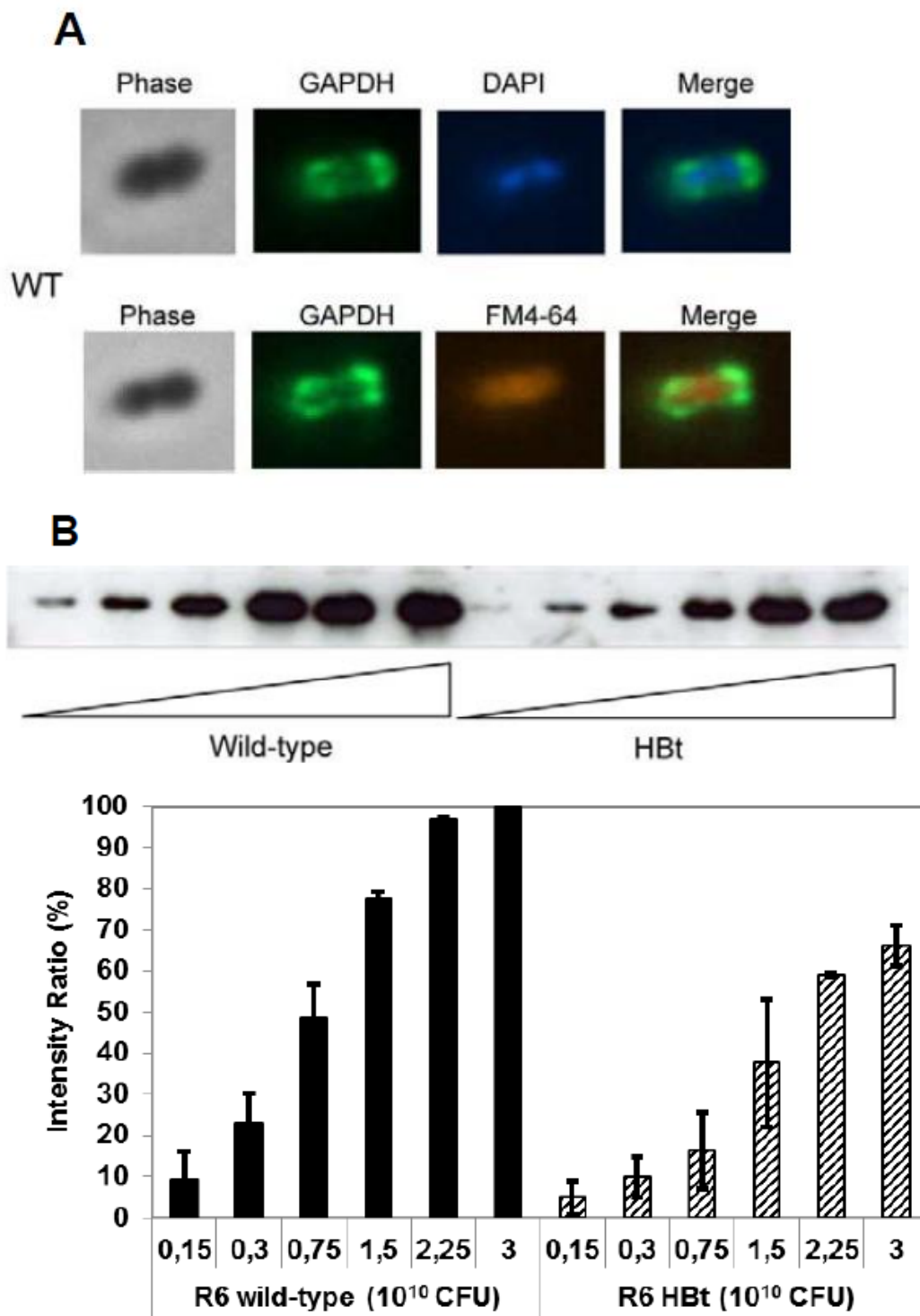


FIGURE 6.



C

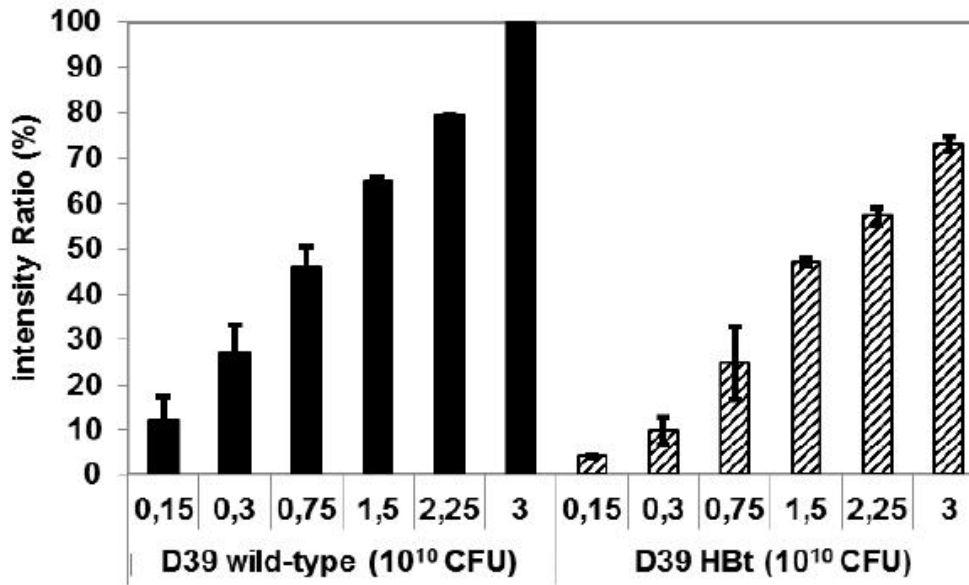
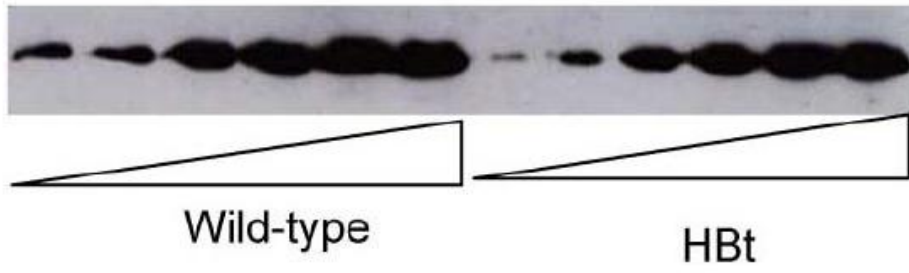
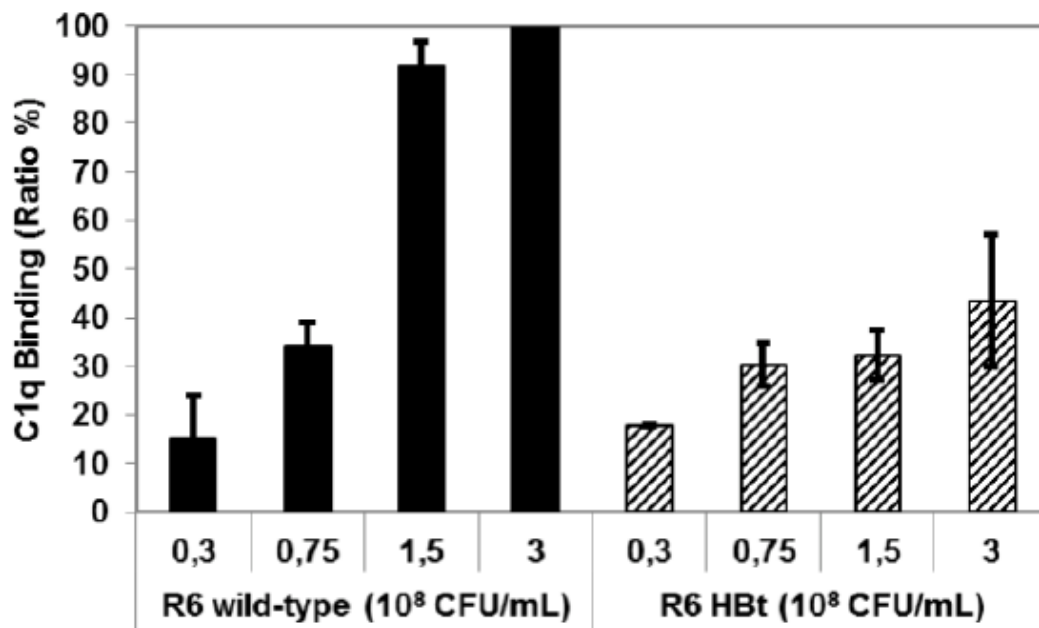
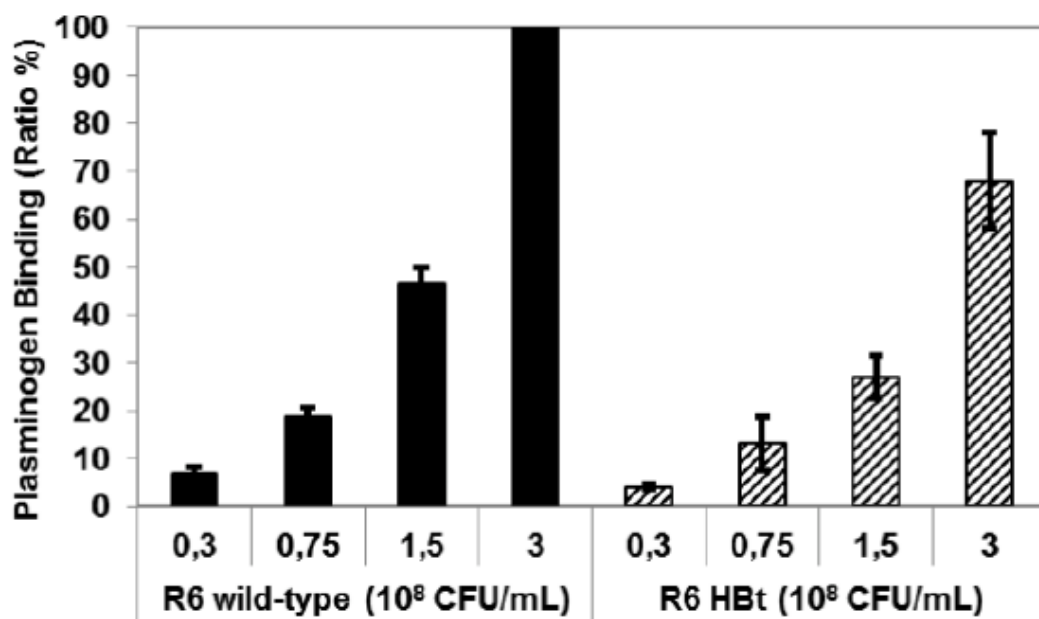


FIGURE 7.

A



B



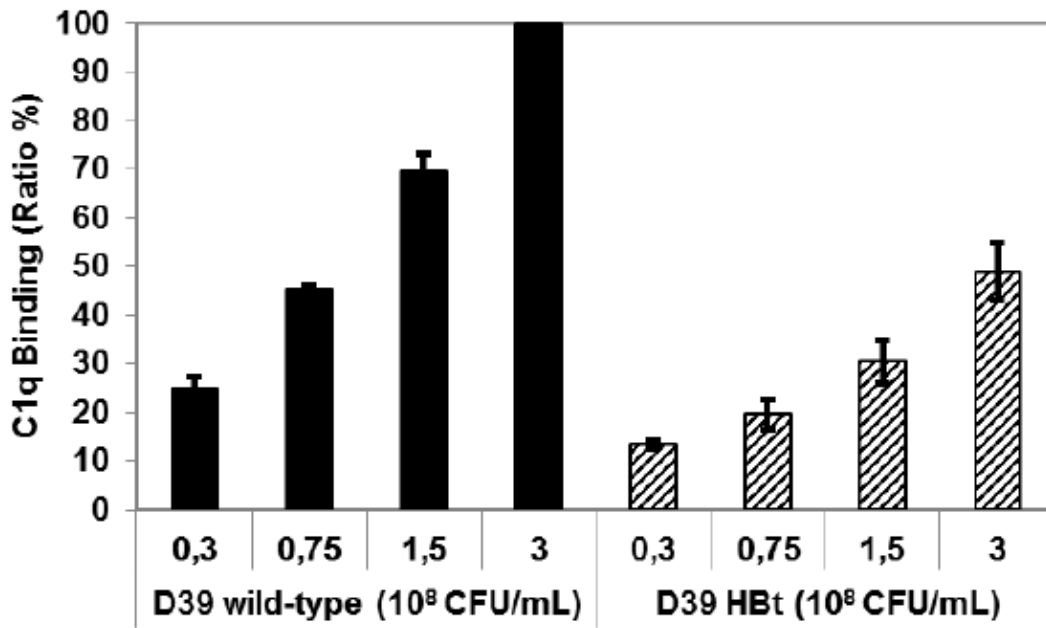
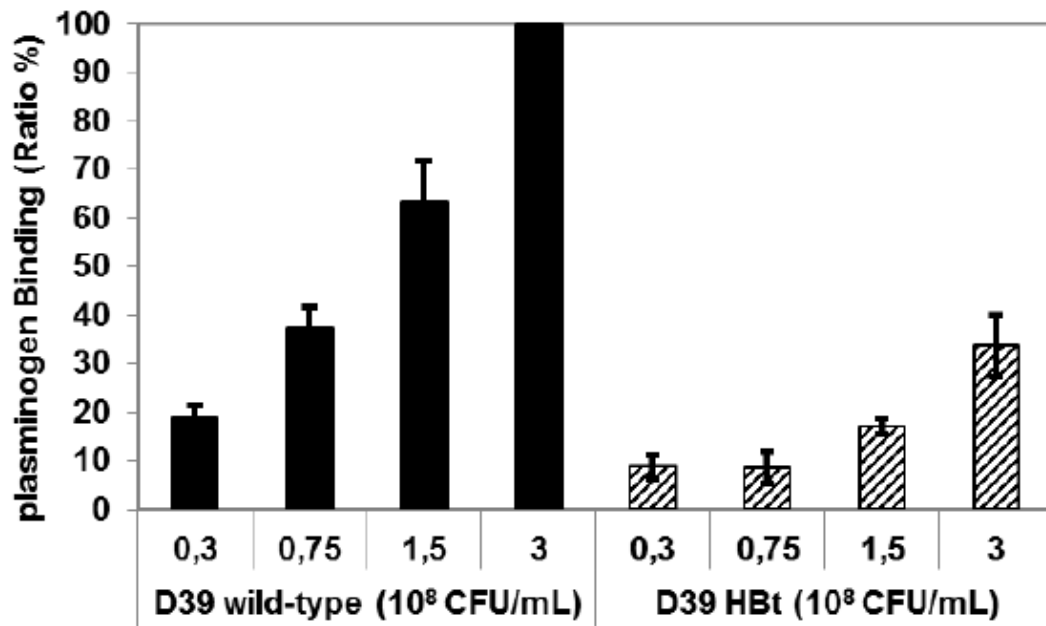
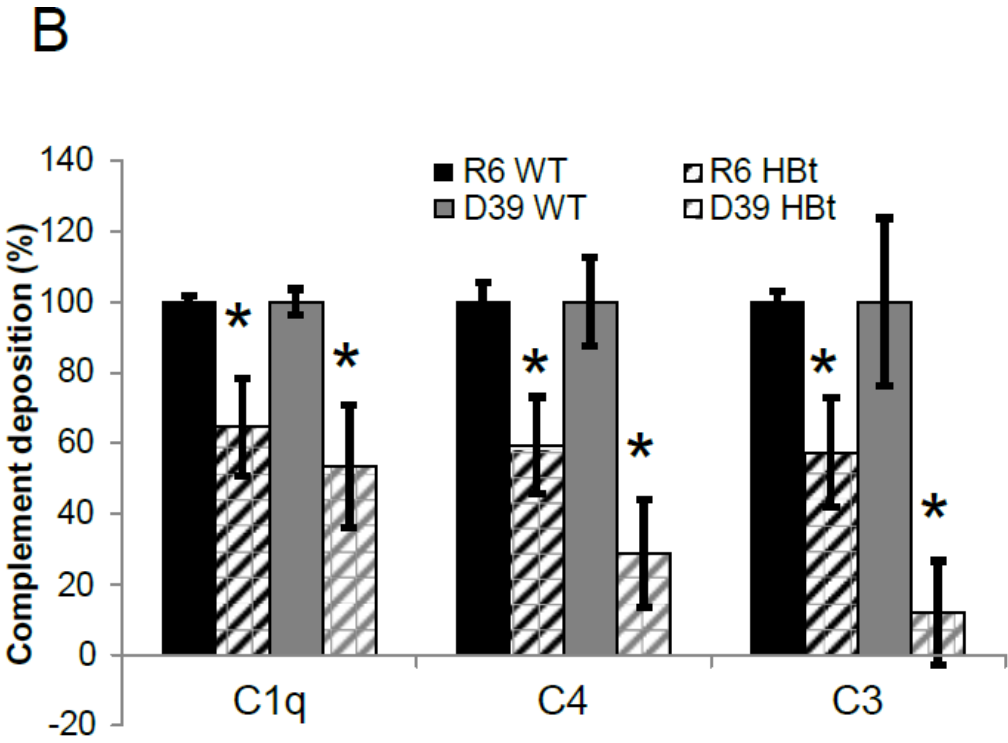
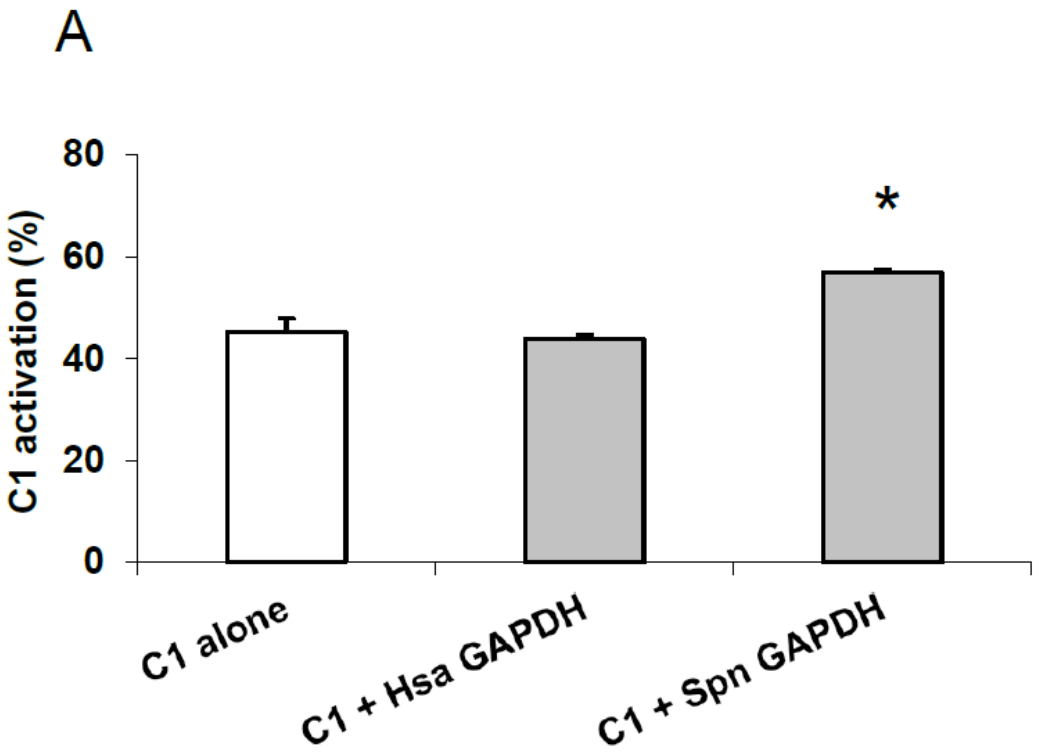
C**D**

FIGURE 8.

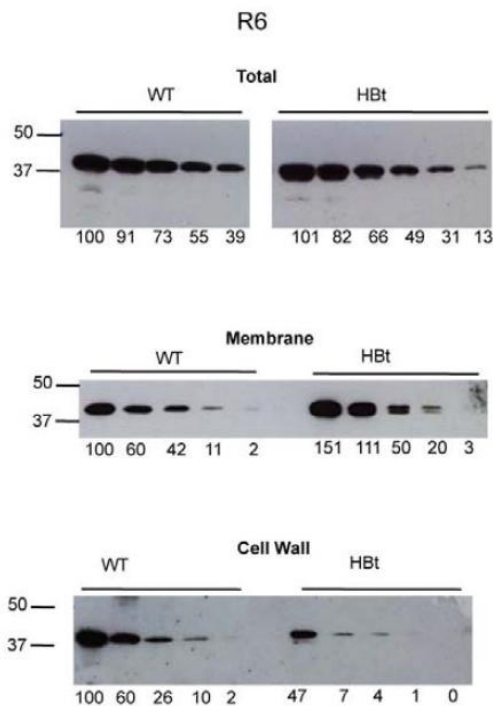


SUPPLEMENTAL DATA

Inhibition of the GAPDH export at the pneumococcal surface analyzed by cell fractionation

The localization and expression level of GAPDH in the wild-type and mutants strains were compared in the different cellular compartments of R6 and D39 strains (Fig. S1). To evaluate the relative quantities of GAPDH between wild-type and mutant strains, the bacterial cell amount was adjusted by optical density measurements and by CFU counting. To increase the reliability in the comparison between wild-type and mutant strains, up to five serial dilutions of each extract were loaded on gels. The chemiluminescence of each spot had been quantified and expressed as the percentage of the most concentrated wild-type sample, arbitrarily referred as the 100%. These values are reported below each spot displayed in Figure S1.

A



B

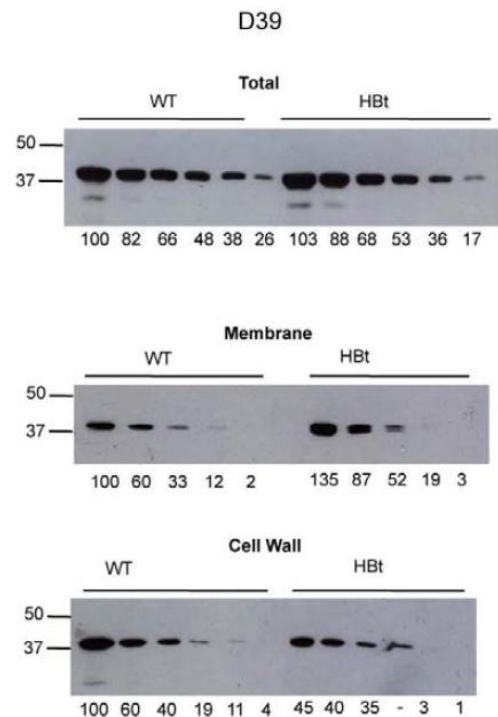


Figure S1 legend: Sub-cellular localization of GAPDH in wild-type and HBt mutant R6 and D39 strains.

An equivalent amount of total bacterial extract and of each sub-cellular fraction, cell wall, cytoplasm and membrane were prepared and serial dilutions of each sample were loaded onto a 12.5% SDS-PAGE gel, analyzed by immunoblotting using a rabbit polyclonal serum directed against pneumococcal GAPDH and revealed by chemiluminescence (ECL). The 50 kDa and 37 kDa markers are indicated on the left side of each blot. Each spot has been quantified and expressed as the percentage compared to the most concentrated wild-type load (100%). These values are reported below each blot and for each sample dilution (A) R6 wild-type and HBt mutant strains. (B) D39 wild-type and HBt mutant strains.

The mean difference of total GAPDH expression in R6 HBt strain compared to the wild-type and is of 10% (Fig S1A, upper panel). We calculated that 54% more GAPDH is associated to the membrane fraction in the R6 HBt strain when compared to the wild-type (Fig S1A, middle panel). Conversely, 83% less GAPDH is associated to the cell wall fraction in the R6 HBt strain when compared to the wild-type (Fig S1A, lower panel). Similar data were obtained when comparing the wild-type and mutant D39 strains (Fig S1B). Comparable amount (mean difference of 3%) of GAPDH is measured in the total fraction (Fig S1B, upper panel). An excess of 53% of GAPDH is membrane-associated in the HBt strain compared to the wild-type strain (Fig S1B, middle panel). Finally, the export of GAPDH is inhibited in the D39 strain since only 51% of GAPDH remains associated to the cell wall in the HBt strain (Fig S1B, lower panel). Taken together, these results show that the fusion of a hydrophobic tail to the GAPDH indeed inhibits the cell surface export.

III-iii- Résultats supplémentaires

III-iii-1- Activation du complément

III-iii-1-a- Dépôt de C1q, C4b et C3b sériques induit par la GAPDH du pneumocoque

Dans le but de compléter les résultats obtenus dans l'article n°1, nous avons confirmé l'implication de la GAPDH dans l'activation du complément par une mesure en phase solide du dépôt des protéines C1q, C4b et C3b à partir de sérum humain normal (NHS), induit par les GAPDH recombinantes immobilisées (Figure III-9). Ces résultats montrent que les GAPDH du pneumocoque et humaine sont toutes deux reconnues de manière similaire par le C1q présent dans le sérum. En revanche, le dépôt de C4b induit par la GAPDH humaine est fortement réduit (-73%) comparé à la GAPDH du pneumocoque. Ce défaut d'activation du complément par la GAPDH humaine est confirmé par les mesures du dépôt de C3b, qui a lieu quand la GAPDH du pneumocoque est incubée avec du NHS mais n'est pas détectable dans le cas de la GAPDH humaine.

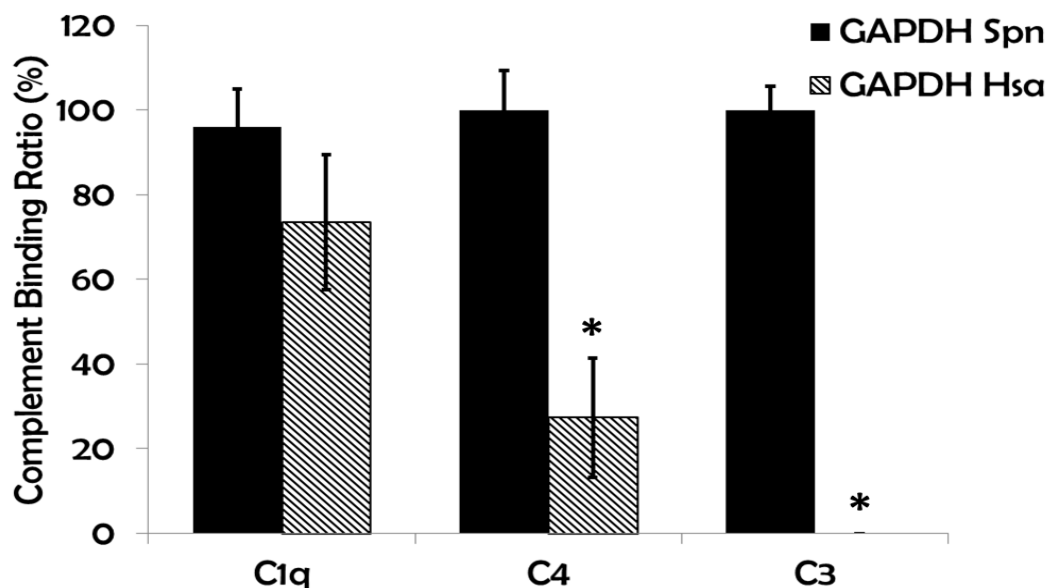


Figure III-9 : Effet des GAPDH recombinantes sur l'activation du complément

Les GAPDH Spn et Hsa recombinantes ainsi que la gelatine ont été immobilisées en plaque 96 puits (1 µg/puits). Le dépôt de C1q, C4b et C3b en présence de 4% de sérum humain normal a été mesuré en utilisant des anticorps anti-C1q, anti-C4 et anti-C3. Les résultats sont exprimés relativement au signal obtenu pour la GAPDH Spn, après soustraction du contrôle Gelatine. Les données montrées représentent la valeur moyenne ± E.T. de trois expériences indépendantes. Chaque expérience a été réalisée en triplicats. Les variations statistiquement significatives (déterminé par ANOVA, $p \leq 0,05$) sont indiqués par *.

Ces résultats confirment que la GAPDH humaine, bien que reconnue par C1q, n'active pas le système du complément, à la différence de la GAPDH du pneumocoque qui active le complément et provoque le dépôt de C4b et C3b.

III-iii-1-b- Implication de C1q dans l'activation du complément par la GAPDH du pneumocoque

Nous avons voulu confirmer que le dépôt de C4b et C3b, détecté à la fois sur le pneumocoque (Figure III-8) et en présence de GAPDH recombinante (Figure III-9), est effectivement induit par la liaison de C1q et donc à l'activation du complément par le complexe C1. Pour ce faire, des tests de dépôt du complément en phase solide ont été réalisés en utilisant un sérum commercial dans lequel C1q a été retiré (NHS Δ C1q). Les souches R6-WT et R6-HBt ainsi que les protéines purifiées GAPDH ont été utilisées dans ces tests.

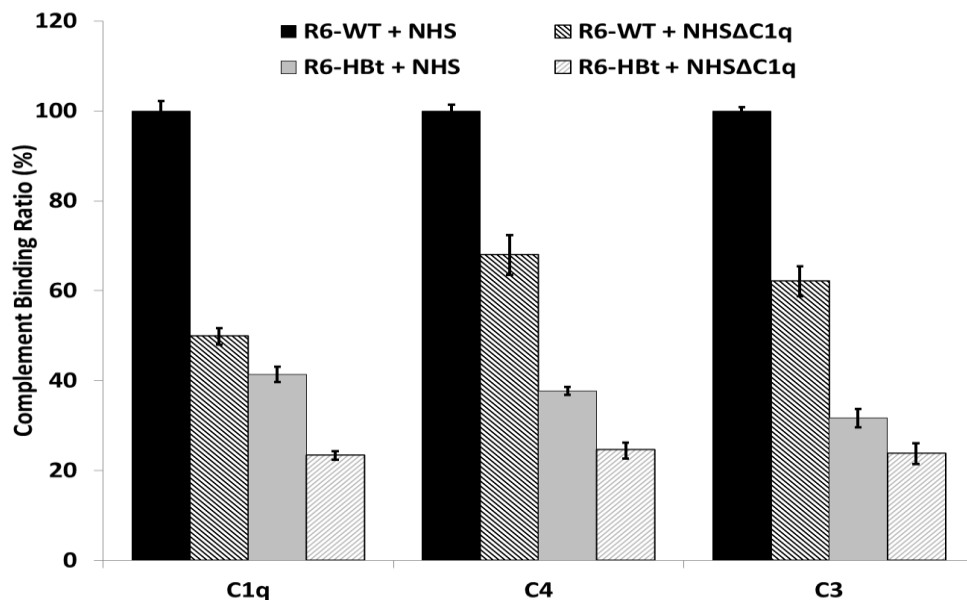


Figure III-10 : Implication de C1q dans l'activation du complément par le pneumocoque

Le dépôt de C1q, C4b et C3b sur les souches R6-WT et R6-HBt en présence de 4% de sérum humain normal (NHS) ou déplété en C1q (NHS Δ C1q) a été mesuré en utilisant des anticorps anti-C1q, anti-C4 et anti-C3. Les résultats sont exprimés relativement au signal obtenu pour la souche R6-WT traitée avec du sérum humain normal, après soustraction du contrôle réalisé sans sérum. Une expérience représentative est présentée, les données montrées représentent la valeur moyenne \pm E.S. des triplicatas.

Les résultats obtenus sur la souche R6 (Figure III-10) montrent qu'un dépôt de C1q est toujours détecté avec le sérum NHS Δ C1q, bien que réduit de 50% par rapport à la valeur obtenue avec le NHS, ce qui indique que le sérum NHS Δ C1q contient encore une quantité significative de C1q. Cette diminution de la fixation de C1q sur les bactéries R6

s'accompagne d'une diminution du dépôt de C4b (-32%) et C3b (-38%). Des résultats similaires ont été obtenus avec la souche R6-HBt (Figure III-10), confirmant le rôle de la GAPDH native dans la liaison à C1q.

Lorsque la GAPDH du pneumocoque immobilisée est traitée avec le sérum NHSΔC1q à 4% (Figure III-11), aucune différence significative n'est détectée dans le dépôt de C1q, C4b et C3b par rapport aux valeurs obtenues avec le NHS (Figure III-11). Les mêmes observations sont faites avec la GAPDH humaine (Figure III-11).

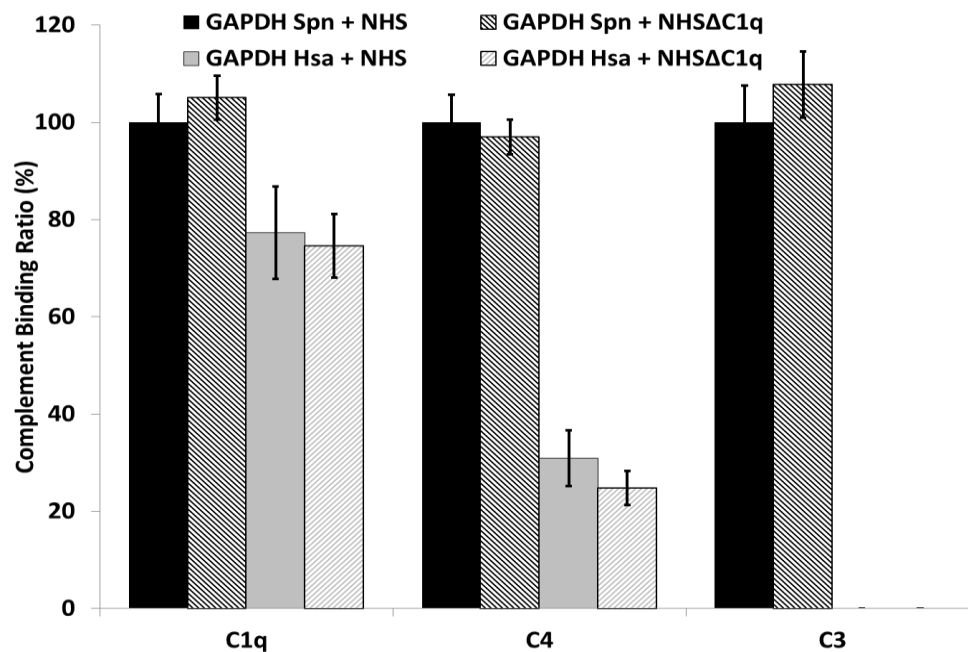


Figure III-11 : Rôle de C1q dans l'activation du complément par la GAPDH

Les GAPDH Spn et Hsa recombinantes ainsi que la gelatine ont été immobilisées en plaque 96 puits (1 µg/puits). Le dépôt de C1q, C4b et C3b en présence de 4% de sérum humain normal (NHS) ou déplété en C1q (NHSΔC1q) a été mesuré en utilisant des anticorps anti-C1q, anti-C4 et anti-C3. Les résultats sont exprimés relativement au signal obtenu pour la GAPDH Spn traitée avec du sérum humain normal, après soustraction du contrôle Gelatine. Une expérience représentative est présentée, les données montrées représentent la valeur moyenne ± E.S. des triplicatas.

Afin de comprendre ces résultats inattendus, la quantité de C1q présent dans le sérum commercial NHSΔC1q a été vérifiée par Western blot (Figure III-12). La quantification de ce Western blot montre que, comparé à du sérum humain normal, 50% du C1q est encore présent dans le sérum commercial NHSΔC1q. Cette donnée est cohérente avec les résultats obtenus lors des tests de dépôt du complément effectués avec les bactéries (Figure III-10). Par contre, il semblerait que la quantité résiduelle de C1q dans NHSΔC1q, utilisé à 4 % dans le test, soit suffisante pour saturer tous les sites de fixation sur les protéines GAPDH. Pour détecter une

différence de signal, il faudrait réduire les quantités de sera NHS et NHS Δ C1q dans ces expériences avec les protéines recombinantes purifiées.

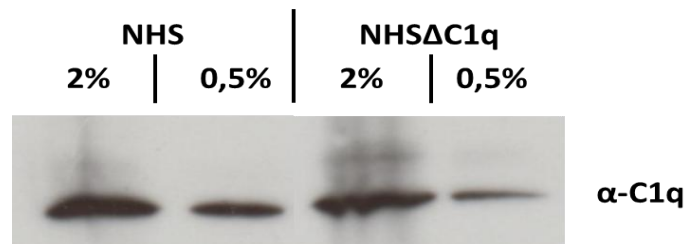


Figure III-12 : Détection de C1q dans les sera NHS et NHS Δ C1q

La quantité de C1q présente dans les sera NHS et NHS Δ C1q a été évaluée par Western blot. 10 μ L de sérum dilué à 2% ou à 0,5% ont été séparés par SDS-PAGE, transféré sur membrane de nitrocellulose et le C1q détecté à l'aide d'un anticorps de lapin anti-C1q et d'un anticorps secondaires anti-lapin couplés à la HRP. La fixation des anticorps a été révélée par chimiluminescence (ECL, *Pierce*). Le résultat du Western blot a été quantifié à l'aide du logiciel ImageJ.

III-iii-1-c- Rôle des IgG dans l'activation du complément

La voie classique du complément peut être activée via l'interaction de C1q avec des IgG humains liés aux antigènes du non-soi, en l'occurrence la GAPDH du pneumocoque. Afin de vérifier que tel n'était pas le cas dans nos expériences, nous avons contrôlé que le sérum NHS utilisé pour les expériences de dépôt du complément ne contenait pas d'anticorps dirigés contre la GAPDH du pneumocoque, qui pourraient faciliter la liaison et l'activation de C1q. Les résultats obtenus montrent qu'aucune liaison significative d'IgG n'est détecté sur les GAPDH recombinantes lorsqu'elles sont traitées avec du sérum humain normal utilisé à 4% (Figure III-13, partie droite).

Malgré l'absence d'IgG anti-GAPDH bactérienne dans le NHS, nous avons néanmoins testé si la fixation d'IgG pouvait interférer dans le dépôt de C1q sur les GAPDH recombinantes lors d'un test d'interaction en phase solide. Pour cela nous avons utilisé un sérum déficient en IgG produit au laboratoire (NHS Δ IgG). Les résultats obtenus montrent qu'aucune différence de fixation de C1q sur la GAPDH du pneumocoque et la GAPDH humaine n'est observée entre le NHS et NHS Δ IgG (Figure III-13 partie gauche). Des tests de dépôt du complément en phase solide sur le pneumocoque montrent également qu'il n'y a pas de différences de dépôt de C1q et C4b sur les souches R6-WT et R6-HBt traitées avec le NHS et le NHS Δ IgG (Figure III-14). Ces données montrent que la fixation de C1q et le dépôt de C4b sont des processus directement reliés à la reconnaissance de la GAPDH.

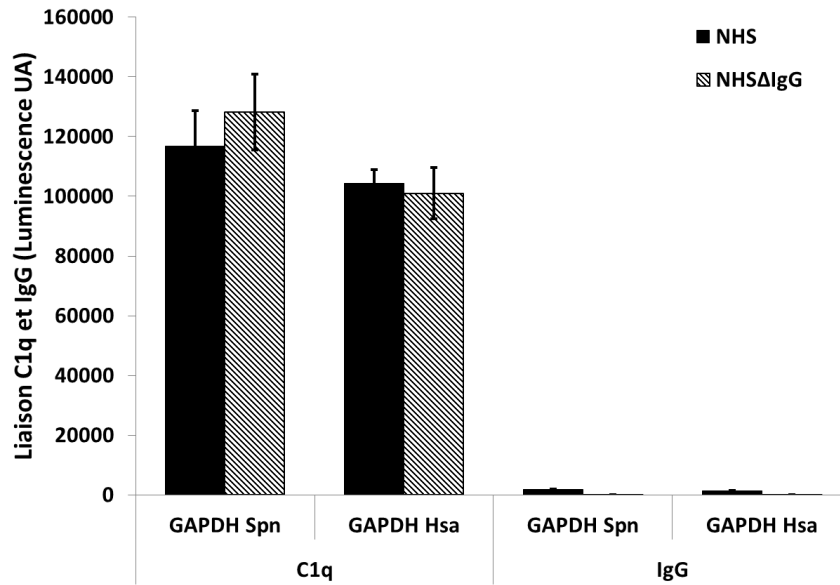


Figure III-13 : Implication des IgG sériques dans l'interaction GAPDH par C1q

Les GAPDH Spn et Hsa recombinantes ainsi que la gelatine ont été immobilisées en plaque 96 puits (1 µg/puits). La fixation de C1q et d'IgG en présence de 4% de sérum humain normal (NHS) ou déplété en IgG (NHSΔIgG) a été mesurée en utilisant des anticorps anti-C1q, anti-IgG. Les valeurs de luminescence brutes, après soustraction du contrôle Gélatine, sont présentées (exprimées en Unité Arbitraire) Une expérience représentative est présentée, les données montrées représentent la valeur moyenne ± E.S. des triplicatas.

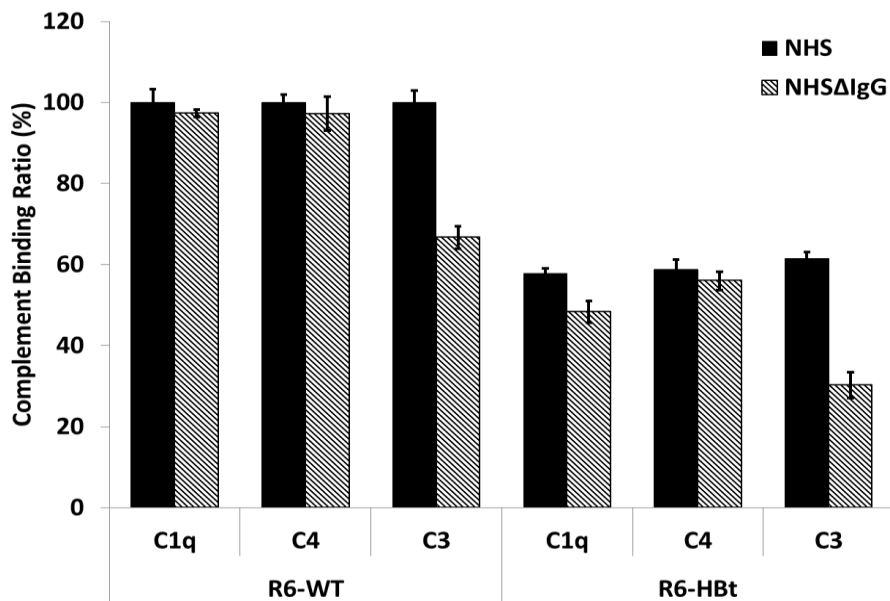


Figure III-14 : Implication des IgG sériques dans l'activation du complément par le pneumocoque

Le dépôt de C1q, C4b et C3b sur les souches R6-WT et R6-HBt en présence de sérum humain normal ou déplété en IgG a été mesuré en utilisant des anticorps anti-C1q, anti-C4 et anti-C3. Les résultats sont exprimés relativement au signal obtenu pour la souche R6-WT traitée avec du sérum humain normal, après soustraction du contrôle réalisé sans sérum. Une expérience représentative est présentée, les données montrées représentent la valeur moyenne ± E.S. des triplicatas.

Nous avons observé une diminution du dépôt de C3b sur les bactéries de type sauvage et HBt lors du traitement par le NHSΔIgG (Figure III-14). Afin de tenter d'apporter une explication à cette observation, nous avons analysé l'intégrité de la population de C3 dans les séra utilisés par Western blot (Figure III-15). C3 est composée de deux chaînes C3α et C3β reliées par un pont disulfure, qui sont détectées dans le NHS lors d'un Western blot réalisé en conditions dénaturantes (Figure III-15, partie gauche). En revanche, on observe dans le NHSΔIgG une diminution de l'intensité de la bande correspondant à C3β comparé au NHS (Figure III-15, partie droite). Cette analyse indique donc une dégradation partielle de C3 dans le NHSΔIgG, qui explique la diminution de dépôt de C3b observée sur les souches R6-WT et R6-HBt en comparaison avec le NHS (Figure III-14).

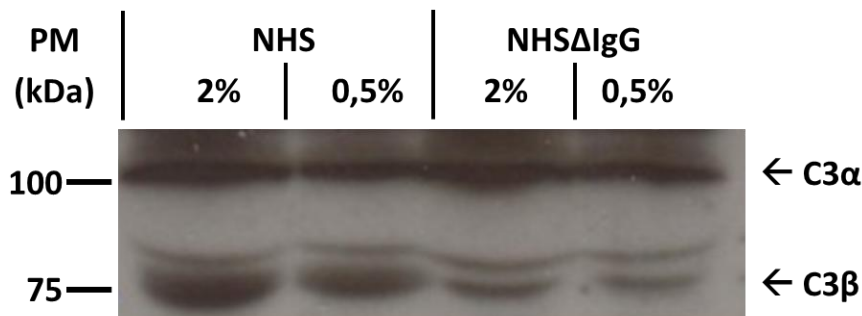


Figure III-15 : Analyse de l'intégrité de C3 dans les séra NHS et NHSΔIgG

L'intégrité du C3 présent dans les séra NHS et NHSΔIgG a été évaluée par Western blot. 10 μ L de sérum dilué à 2% ou à 0,5% ont été séparés par SDS-PAGE, transféré sur membrane de nitrocellulose et le C3 détecté à l'aide d'un anticorps de lapin anti-C3 (*Abcam*) et d'un anticorps secondaires anti-lapin couplés à la HRP. La fixation des anticorps a été détectée par chimiluminescence (ECL, *Pierce*).

De façon générale, ces résultats confirment que c'est la reconnaissance directe de la GAPDH du pneumocoque par C1q qui permet l'activation du complément en surface du pneumocoque. Les données obtenues prouvent en effet qu'il n'y a pas dans le NHS d'IgG susceptibles de faciliter la reconnaissance de la GAPDH par C1q et d'induire le dépôt de C4b et C3b sur le pneumocoque en activant la voie classique.

III-iii-2- Effet du recrutement de plasmine par la GAPDH sur le dépôt du complément

Des travaux précédents ont montré que la GAPDH du pneumocoque est capable de recruter le plasminogène ou la plasmine de l'hôte [358]. Nous avons également observé que les formes recombinantes de GAPDH interagissent avec le plasminogène (Figure III-3 B). Par

conséquent, nous avons cherché à savoir si cette interaction pouvait affecter la reconnaissance de la GAPDH par C1q et l'activation du complément.

III-iii-2-a- Sites de fixation indépendants de C1q et du plasminogène

Dans un premier temps nous avons tenté de déterminer si le recrutement du plasminogène par la GAPDH du pneumocoque pouvait inhiber l'interaction GAPDH-C1q. Lors de tests d'interaction en phase solide, la pré-incubation en solution de la GAPDH avec du plasminogène inhibe complètement l'interaction de la GAPDH avec le plasminogène immobilisé (Figure III-16) mais n'interfère que très peu avec l'interaction de la GAPDH et C1q immobilisé (Figure III-16).

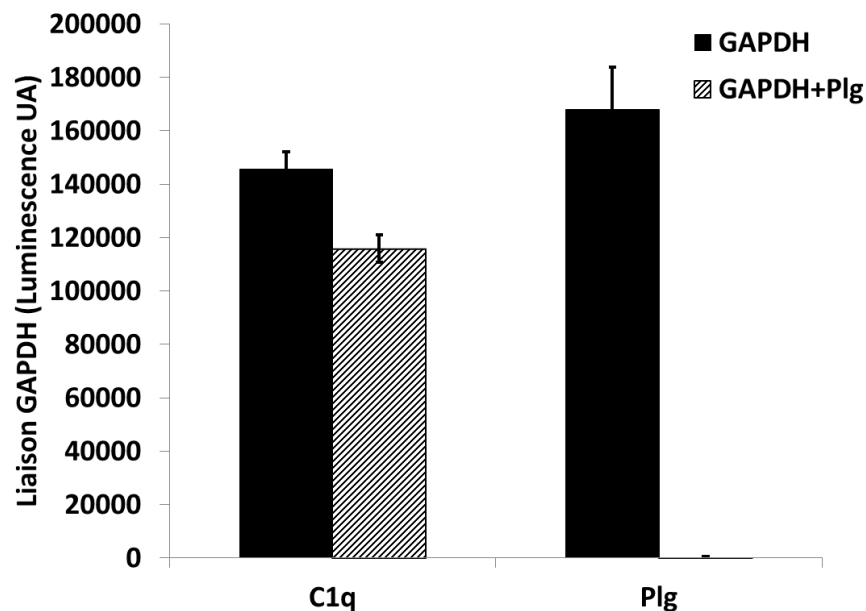


Figure III-16 : liaison de la GAPDH Spn à C1q et au plasminogène immobilisés en présence de plasminogène soluble

Le C1q, le plasminogène ou la gelatine ont été immobilisés en plaque 96 puits (1 µg/puits). La fixation de la GAPDH du pneumocoque (1 µg), seul ou préalablement incubée 1h en présence de 1 µg de plasminogène, a été mesurée en utilisant un anticorps anti-GAPDHSpn. Les valeurs de luminescence brutes, après soustraction du contrôle Gélatine, sont présentées (exprimées en Unité Arbitraire) Une expérience représentative est présentée, les données montrées représentent la valeur moyenne ± E.S. des triplicats.

Des tests d'interaction en phase solide sur C1q immobilisé montrent que l'ajout de quantités croissantes de plasminogène pré-incubé en solution avec la GAPDH ne permet pas d'inhiber l'interaction GAPDH-C1q (Figure III-17). On remarque au contraire que la fixation de GAPDH peut être augmentée par l'ajout de plasminogène dans ces conditions expérimentales. Ainsi, pour des ratios GAPDH / plasminogène de 1/0,1 à 1/1 on observe une

augmentation dose-réponse de l'interaction de la GAPDH du pneumocoque avec C1q immobilisé. Au delà l'interaction semble relativement stable, les différences de fixation de la GAPDH entre les ratios 1/1, 1/5 et 1/10 n'étant pas statistiquement significatives (Figure III-17). Ces résultats montrent que la fixation de C1q et du plasminogène sur la GAPDH du pneumocoque sont des processus indépendants.

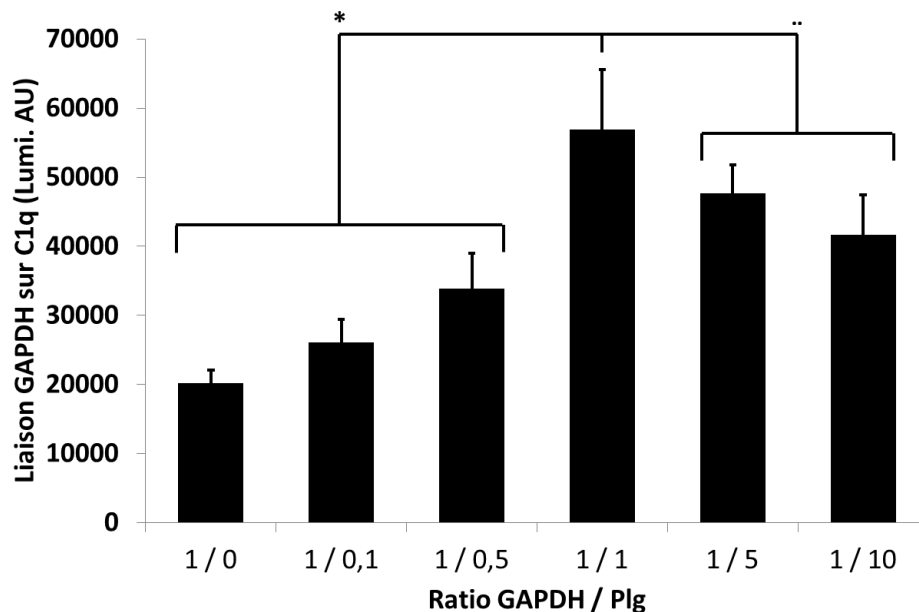


Figure III-17 : Le plasminogène n'inhibe pas l'interaction GAPDH-C1q en test d'interaction en phase solide

Le C1q ou la gelatine ont été immobilisés en plaque 96 puits (1 µg/puits). La fixation de la GAPDH du pneumocoque (1 µg), seul ou préalablement incubée 1h en présence de différentes quantités (0,1 ; 0,5 ; 1 ; 5 ; 10 µg) de plasminogène, a été mesurée en utilisant un anticorps anti-GAPDHSpn. Les valeurs de luminescence brutes, après soustraction du contrôle Gélatine, sont présentées (exprimées en Unité Arbitraire) Une expérience représentative est présentée, les données montrées représentent la valeur moyenne ± E.S. des triplicats. Les variations statistiquement significatives (déterminé par ANOVA, $p \leq 0,05$) sont indiqués par *, ** indique des variations non significatives.

Pour confirmer ces données, des expériences de résonance plasmonique de surface ont été réalisées. La GAPDH a été immobilisée et C1q, le plasminogène, ou un mélange équimolaire de C1q et de plasminogène ont été injectés (Figure III-18). L'association de chacun des ligands injecté indépendamment est détectée dans les conditions du test, bien que le signal de l'interaction plasminogène-C1q soit plus important. Lorsque le mélange des deux ligands est injecté, le signal obtenu correspond à la superposition des réponses détectées pour les injections indépendantes. Ainsi, si le sensorgramme obtenu lors de l'injection de C1q est soustrait à celui de l'injection du mélange, on obtient une réponse se superposant parfaitement avec celle du plasminogène seul, ce qui confirme que les sites de fixation sont indépendants.

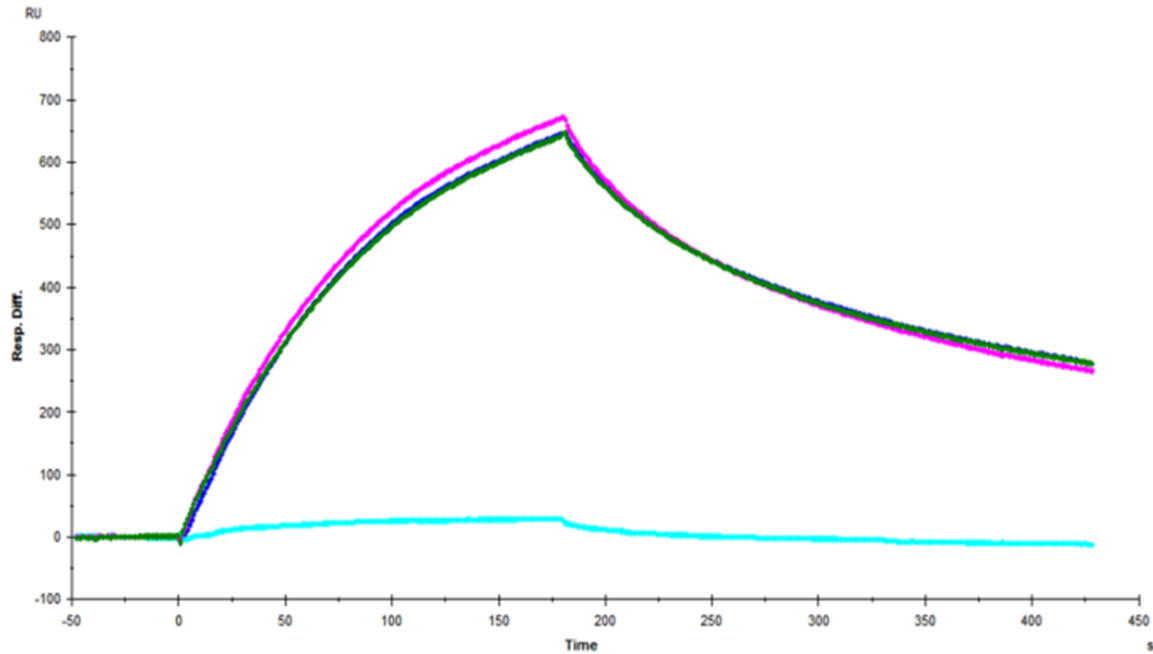


Figure III-18 : L'interaction GAPDH-C1q n'est pas inhibée par le plasminogène en résonance plasmonique de surface

Liaison de 10 nM de C1q (cyan), de 10 nM de plasminogène (bleu) ou d'un mélange équimolaire de ces deux analytes (magenta) à la GAPDH du pneumocoque immobilisée sur une sensorchip CM5. La soustraction du sensorgramme de C1q à celui du mélange est présentée en vert. Les blancs (piste activée/désactivée et injection de tampon) ont été soustraits à chaque sensorgramme.

III-iii-2-b- Effet de la plasmine sur le dépôt du complément

La plasmine étant une protéase pouvant dégrader divers substrats, nous avons envisagé la possibilité qu'elle puisse avoir un effet sur le dépôt du complément. Nous avons tout d'abord vérifié par un test d'activité que la GAPDH est capable d'accueillir une activité plasmine. Ce test a montré que la GAPDH du pneumocoque immobilisée, incubée avec du plasminogène puis de la streptokinase (activateur du plasminogène), présente une activité plasmine dose-dépendante, démontrée par l'hydrolyse d'un substrat chromogénique (N-(p-Tosyl)-Gly-Pro-Lys 4-nitroanilide) (Figure III-19).

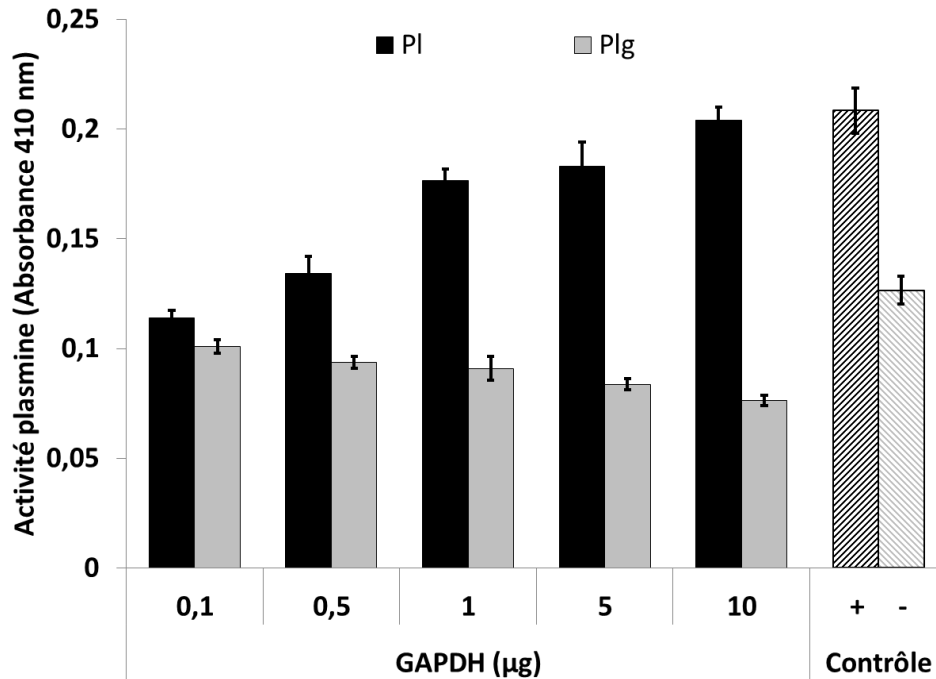


Figure III-19 : Le plasminogène recruté par la GAPDH est activable en plasmine

La capacité de recrutement d'activité plasmine de la GAPDH du pneumocoque a été évaluée par un test colorimétrique. Des quantités croissantes de GAPDH (0,1 ; 0,5 ; 1 ; 5 ; 10 µg) ou 10 µg de BSA ont été immobilisées en plaque 96 puits puis incubées avec 2 µg de plasminogène. Le plasminogène a ensuite été activé ou non en plasmine par l'ajout de streptokinase (activation) ou de PBS (PI : plasminogène/streptokinase, Plg : Plasminogène/PBS). L'activité plasmine a été mesurée par l'ajout d'un substrat chromogénique dont l'absorbance a été mesurée à 410 nm. Contrôle + : mélange de plasminogène, streptokinase et substrat. Contrôle - : BSA/plasminogène/streptokinase/substrat.

Nous avons par la suite mesuré l'effet de l'activité plasmine sur le dépôt de protéines du complément induit par la GAPDH du pneumocoque immobilisée. Les résultats obtenus montrent que l'ajout de plasminogène au NHS provoque une augmentation (25%) du dépôt de C1q, ainsi que de C4b (75%) et C3b (40%) (Figure III-20). Lorsque la streptokinase est ajoutée au NHS, nous avons observé une augmentation très importante (600%) de la fixation de C1q (Figure III-20) qui se traduit par contre, par une diminution de la quantité de C4b et C3b déposés sur la GAPDH, de respectivement 55% et 87% (Figure III-20). Ces mêmes effets sont observés, bien que dans une moindre mesure, lorsque la GAPDH est pré-incubée avec du plasminogène avant l'incubation avec le NHS et la streptokinase : le taux de liaison de C1q est augmenté de 60%, et ceux de C4b et C3b sont inhibés de respectivement 30% et 63% (Figure III-20). Ce résultat inattendu s'explique par le mode d'activation du plasminogène par la streptokinase. En effet les activateurs physiologiques du plasminogène (uPA et tPA) clivent la liaison peptidique entre l'arginine 561 et la valine 562 du plasminogène. La fonction amine de la valine libérée par ce clivage forme un pont salin avec l'aspartate 740 qui induit un

changement de conformation permettant l'activation en plasmine. En revanche la streptokinase interagit avec le plasminogène et une fonction amine apportée par un résidu de la streptokinase forme le pont salin [445]. La concentration de streptokinase est donc un élément limitant pour l'activation du plasminogène. Le sérum humain contenant environ 1,6 μM de plasminogène [446], une dilution à 4% en contient 64 nM. La streptokinase étant utilisée à 50 nM, 78% du plasminogène sérique peut être activé en plasmine. Dans ces conditions, la streptokinase étant ajoutée au sérum, le plasminogène exogène fixé à la GAPDH n'est probablement pas ou peu activé. La plasmine ayant une affinité pour la GAPDH du pneumocoque supérieure à celle du plasminogène [358], il est envisageable qu'une partie du plasminogène recruté par la GAPDH soit remplacé par de la plasmine. Il est cependant probable que dans ces conditions, l'activité plasmine associée à la GAPDH soit moins importante quand elle a été préalablement incubée avec du plasminogène, ce qui explique que l'inhibition du dépôt de C4b et C3b soit réduite.

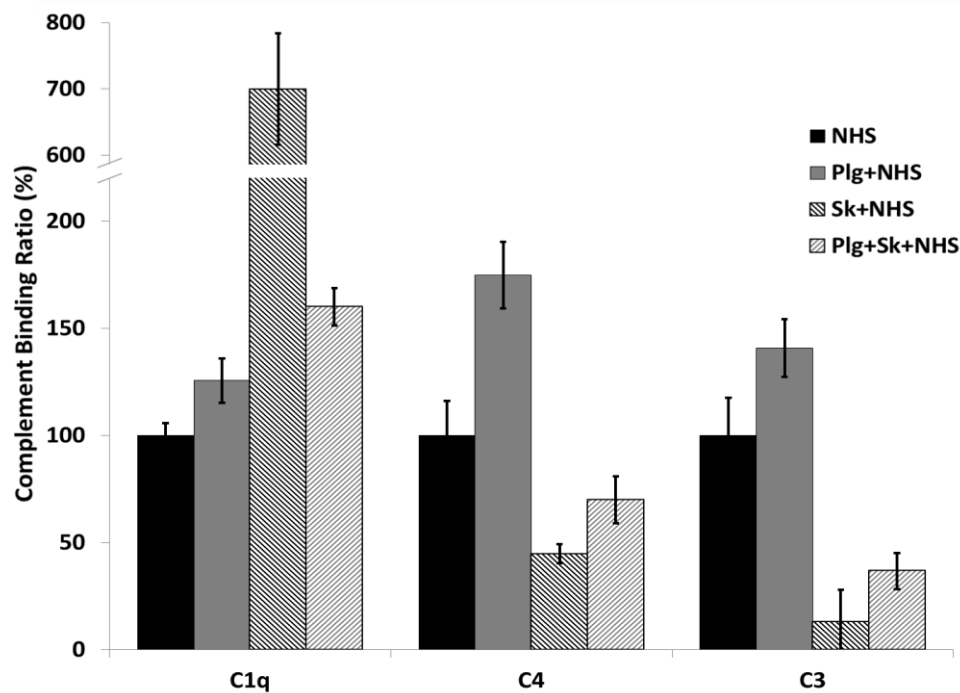


Figure III-20 : Effet de la plasmine sur le dépôt de C1q, C4 et C3

La GAPDH Spn recombinantes ou la gelatine ont été immobilisées en plaque 96 puits (1 μg /puits), puis incubées ou non avec 4 μg de plasminogène (Plg). Le dépôt de C1q, C4b et C3b en présence de 4% de sérum humain normal (NHS) contenant ou non de la streptokinase (Sk) pour activer le plasminogène en plasmine a été mesuré en utilisant des anticorps anti-C1q, anti-C4 et anti-C3. Les résultats sont exprimés relativement au signal obtenu pour la GAPDH Spn traitée avec du sérum humain normal, après soustraction du contrôle Gelatine. Une expérience représentative est présentée, les données montrées représentent la valeur moyenne \pm E.S. des triplicats.

Une interprétation possible de la diminution du dépôt de C4b et C3b serait une dégradation protéolytique des protéines du complément induite par la plasmine. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons analysé le devenir de la protéine C3.

Des pneumocoques de souche R6-WT fixés ont été incubés ou non avec du plasminogène puis de la streptokinase avant d'être lavés et mis en présence de NHS ou de C3 purifié. La quantité de C3 restant dans le surnageant après incubation a été mesurée par Western blot. Les résultats obtenus montrent que lorsque le plasminogène est activé en plasmine à la surface du pneumocoque, la quantité de C3 présent dans le sérum diminue de 50%. Aucune différence n'est observée quand le pneumocoque est préalablement incubé avec le plasminogène seul, la streptokinase seule, ou uniquement du PBS. Un effet identique est observé avec le C3 purifié (Figure III-21). Dans les conditions expérimentales utilisées ici, C3 n'est pas détecté associé aux bactéries (résultats non montré).

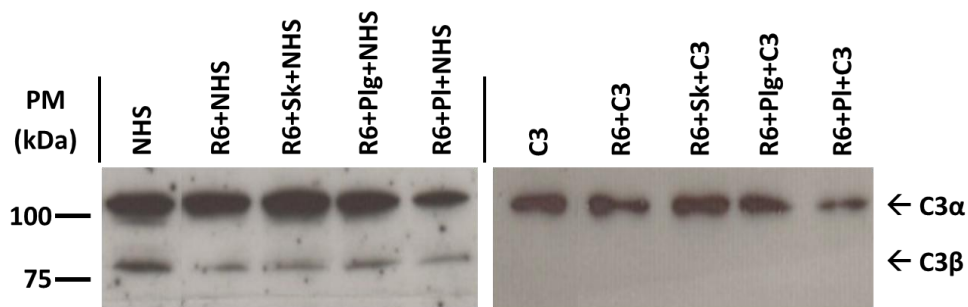


Figure III-21 : Dégradation de C3 par la plasmine recrutée en surface

1×10^8 CFU de pneumocoques de souche R6 fixées au paraformaldéhyde ont été incubées ou non avec 5 μ g de plasminogène (Plg), puis saturées avec 1% de BSA. Les bactéries ont ensuite été traitées ou non à la streptokinase (Sk) afin d'activer le plasminogène en plasmine (Pl). Les bactéries ont ensuite été incubées avec 0,5% de NHS ou 5 μ g/mL de C3 purifié diluées en PBS. Après incubation, le surnageant a été collecté et l'intégrité du C3 a été évaluée par Western blot à l'aide d'un anticorps de lapin anti-C3 (*Abcam*).

Les résultats présentés ici montrent que l'apport de plasminogène exogène, recruté en surface par le pneumocoque, augmente le dépôt de C1q, C4b et C3b. Il est probable que la fixation accrue de C1q à la GAPDH en présence de plasminogène observées précédemment (Figure III-17) permette une meilleure activation du complément. L'activation du plasminogène par l'ajout de streptokinase augmente également le dépôt de C1q, mais provoque une diminution du dépôt de C4b et C3b qui est probablement due à la protéolyse de C4 et C3 par la plasmine recrutée en surface du pneumocoque. Le recrutement de plasmine par la GAPDH du pneumocoque permet donc de réduire le dépôt de C4b et C3b, ce qui représente potentiellement un mécanisme d'échappement à la phagocytose.

III-iii-3- Déterminants structuraux de l'interaction GAPDH Spn-C1q

Bien que les GAPDH humaine et bactérienne soient toutes deux reconnues par C1q, une différence importante dans l'activation du complément en réponse à ces interactions a été observée. En effet, la reconnaissance de la GAPDH du pneumocoque permet l'activation du complément, ce qui n'est pas le cas de la GAPDH humaine. L'étude de ces interactions permettrait de mettre en évidence les déterminants structuraux impliqués dans l'activation du complexe C1, afin de comprendre comment C1q discrimine ses ligands pour n'activer le complément qu'en cas de reconnaissance d'un ligand signalant un danger.

III-iii-3-a- identification de résidus impliqués dans l'interaction

Nous avons cherché à mettre en évidence, pour la GAPDH du pneumocoque, les résidus impliqués dans l'interaction avec C1q, par une approche de « peptide mapping ». Des peptides de 20 acides aminés, avec un chevauchement de 10 acides aminés entre chaque peptide, couvrant l'ensemble de la séquence de la GAPDH du pneumocoque ont été synthétisés par la société *Millegen*. La fixation de C1q sur l'ensemble des 33 peptides a été analysée par Dot blot. Les peptides sont immobilisés sur membranes de nitrocellulose qui sont saturées puis incubées avec C1q, dont la fixation est détectée à l'aide d'anticorps spécifique. Après avoir répété l'expérience à trois reprises, la quantification des Dot blot obtenus a permis de mettre en évidence de manière assez reproductible (positif dans au moins 2 des 3 expériences) la fixation de C1q sur les peptides 1, 2, 12, 16, 18, 29, 30 et 31 (Figure III-22).

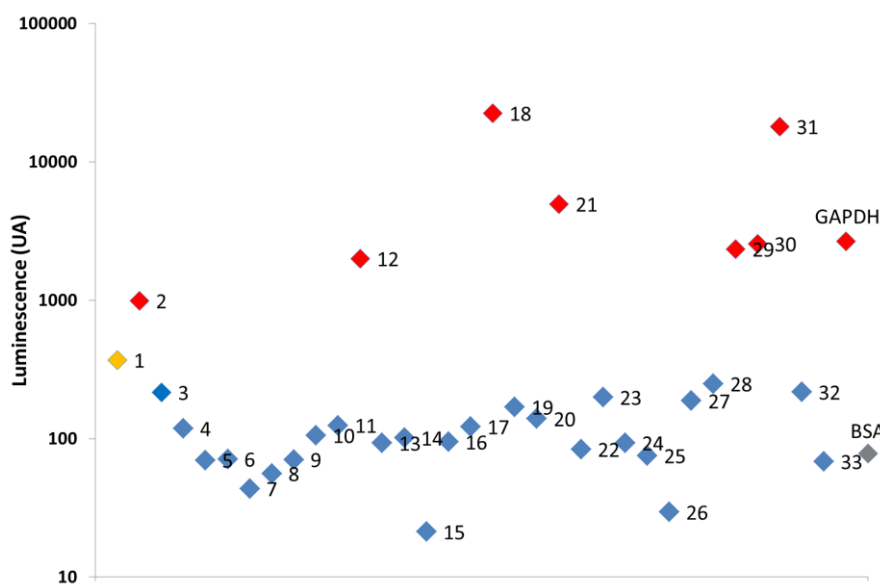


Figure III-22 : Reconnaissance de peptides de la GAPDH Spn par C1q

10 µg de chaque peptide synthétique, de GAPDH ou de BSA ont été immobilisés sur membrane de nitrocellulose puis incubés avec une solution contenant 10µ/mL de C1q. La fixation de C1q a été détectée à l'aide d'un anticorps de lapin anti-C1q et d'un anticorps secondaires anti-lapin couplés à la HRP. La fixation des anticorps a été révélée par chimiluminescence (ECL, *Pierce*). La quantification à l'aide du logiciel ImageJ d'un Dot blot représentatif est présentée, les valeurs sont données en unités arbitraires (UA) de luminescence. Bleu : fixation de C1q ne différant pas significativement du contrôle BSA, orange : faible fixation de C1q, rouge : forte fixation de C1q.

Afin de confirmer ces interactions, nous avons testé la capacité de tous les peptides à inhiber la fixation de C1q à la GAPDH lors d'un test d'interaction en phase solide. Le C1q immobilisé en plaque 96 puits a été incubé avec des concentrations croissantes de peptides, après quoi la GAPDH du pneumocoque recombinante a été ajoutée. La mesure de la fixation de la GAPDH montre que parmi les 33 peptides, 3 sont capables d'inhiber l'interaction GAPDH-C1q : les peptides 12, 16 et 31 (Figure III-23). La localisation de ces peptides dans la séquence de la GAPDH du pneumocoque est présentée dans la Figure III-24. On remarque que la séquence des peptides ainsi identifiées est identique à 45% dans la GAPDH humaine pour les peptides 12 et 31. Concernant le peptide 16, l'identité de séquence avec la GAPDH humaine est de 75%. Sur les trois peptides identifiés, deux sont donc assez proches entre les GAPDH humaine et bactérienne, alors que le troisième l'est fortement. Ces différences dans les peptides identifiés comme sites de fixation potentiels pourraient expliquer la différence de reconnaissance des deux GAPDH par C1q.

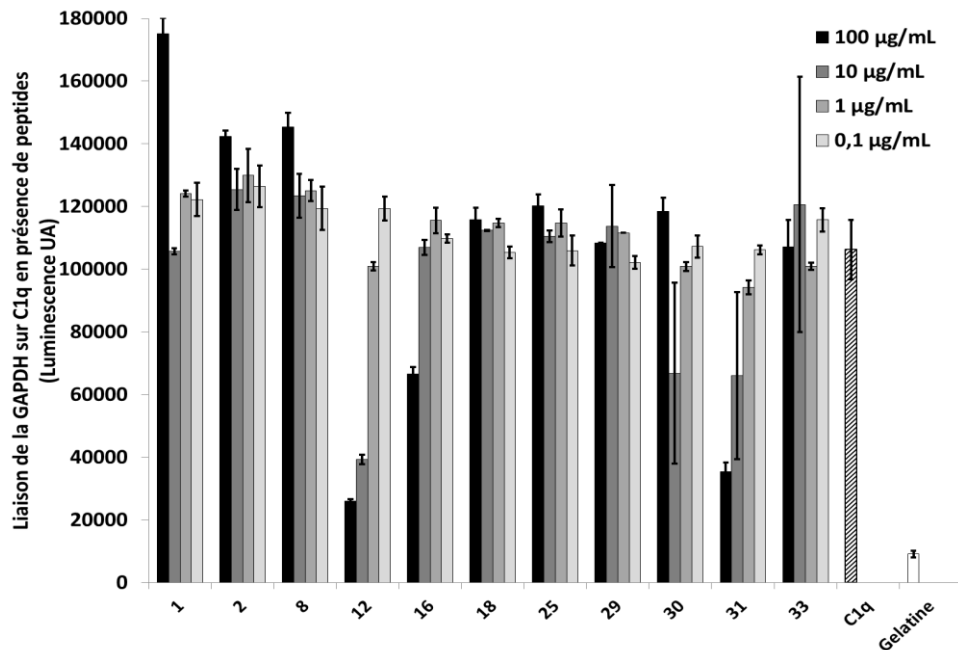


Figure III-23 : Inhibition de l'interaction GAPDH-C1q par les peptides

Le C1q ou la gelatine ont été immobilisés en plaque 96 puits (1 µg/puits). Après saturation, le C1q a été incubé avec différentes concentrations de chaque paptides (0,1 ; 1 ; 10 ; 100 µg/mL). 1 µg de GAPDH du pneumocoque a ensuite été ajoutée dans chaque puits. La fixation de la GAPDH a été mesurée en utilisant un anticorps anti-GAPDHSpn. Les valeurs de luminescence brutes sont présentées (exprimées en Unité Arbitraire) Une expérience représentative est présentée, les données montrées représentent la valeur moyenne ± E.S. des triplicats.

```

GAPDH Spn M-VVKVGINGFGRIGRLAFRRIQNVEGVEVTRIND-LTDPVMLAHLKLYDTTQGRFDGTV 58
GAPDH Hsa MGKVKVGVNGFGRIGRLVTRAAFNSGKVDIVAINDPFDLNYMVMFMFQYDSTHGKHFHGTV 60
* ****:*****. * * *:: *** : * ::::*:*:*:*:***

GAPDH Spn EVKEGGFEVNGKFIKVSARDPEQIDWATDGEIVLEATGFFAKKEAAEKHLKGGAKKVV 118
GAPDH Hsa KAENGLKLVINGNPITIFQERDPSKIKWGDAGAAYVVESTGVFTTMEKAGAHLQGGAKRVI 120
:::* : **: *.: ****:*. *.* *:*:*. * * **:****:

GAPDH Spn I TAPGGNDVKT VVENTNHDVLDGTE TVISGASCTTNC LAPMAKALQDNFGVVEGLMTTIIH 178
GAPDH Hsa I SAPSA-DAPMFVMGVNHEKYDNSLKIISNASCTTNC LAPLAKVIHDNFGIVEGLMTTVH 179
*:**.. * . *:***: *.: **:*****:***:****:*****:*

GAPDH Spn AYTGDQMILDGPHRGGDLRRARAGAANIVPNSTGAAKAIGLVIPELNGKLDGSAQRVPTP 238
GAPDH Hsa AITATQKTVDGPS-GKLWRDGRGALQNIIPASTGAAKAVGKVIPELNGKLTGMAFRVPTA 238
* * . * :*** * * . *.. **:* *****:* ***** * * ****.

GAPDH Spn TGSVTELVAVLEKNVTVDEVNAAMKAASNES----YGYTEDPIVSSDIVGMSYGSFLDAT 294
GAPDH Hsa NVSVVDLTCRLEKPAKYDDIKKVVKQASEGPLKGLGYTEHQVSSDFNSDTHSSTFDAG 298
. **:*.. *** .. *::: .* **. ****. :****: . :.* ***

GAPDH Spn QTKVLDVDGKQLVKVVSWYDNEMSYTAQLVVRTLEYFAKIAK 335
GAPDH Hsa AGIALN--DHFVKLISWYDNEFGYSNRVVDLMAHMASKE- 335
.*: .:***:*****:*. : * : :.*

```

Figure III-24 : Alignement des séquences protéiques des GAPDH Hsa et Spn

Les trois peptides de la GAPDH du pneumocoque identifiés comme impliqués dans l'interaction avec C1q sont surlignés en cyan, magenta et vert.

Le degré de conservation des résidus est indiqué par le code suivant : * résidus identiques, : forte similarité, . faible similarité.

III-iii-3-b- Structure cristallographique de la GAPDH du pneumocoque

En parallèle de ce travail, nous avons produit et purifié des quantités de GAPDH recombinante suffisantes pour permettre la résolution de sa structure cristallographique. Les travaux de cristallogenèse préliminaires ont été réalisés par Anne-Marie Di Guilmi, et la structure de la GAPDH du pneumocoque a été résolue à 1,9Å par Christophe Moreau et Christine Gaboriaud (IBS, groupe IRPAS) (Figure III-25).

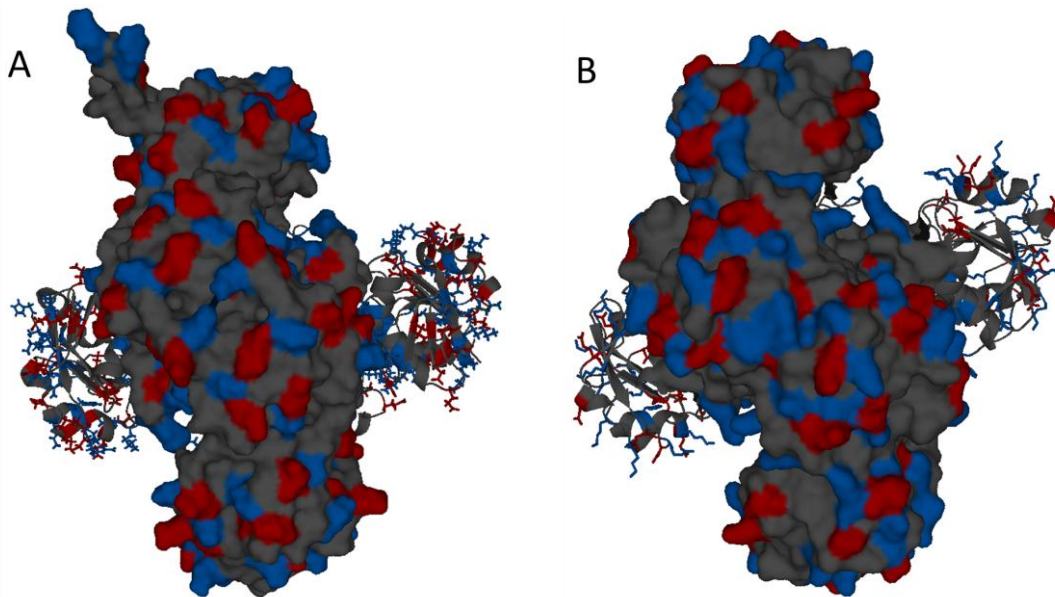


Figure III-25 : Structures cristallographiques des GAPDH Spn et Hsa

Représentation schématique de la structure cristallographique de la GAPDH du pneumocoque (A) et humaine (B), pour chaque structure la surface de l'un des dimères est représentée et le deuxième dimère est visualisé sous forme « rubans ». Les résidus acides sont représentés en rouge et les résidus basiques en bleu.

La GAPDH du pneumocoque se présente sous la forme d'un tétramère, consistant en l'association de deux dimères. Contrairement à d'autres structures de GAPDH résolues à ce jour, les deux dimères formant la GAPDH du pneumocoque ne sont pas associés sur un même plan, mais se présentent à 90° l'un par rapport l'autre comme chez la GAPDH humaine (Figure III-25 A et B). De plus la superposition des deux structures montre que les deux GAPDH présentent un repliement très similaire. On observe également que la GAPDH du pneumocoque présente plus de charges négatives en surface que la GAPDH humaine (Figure III-25 A et B).

Les résidus correspondant aux peptides identifiés précédemment comme interagissant avec C1q sont pour la plupart enfouis dans la structure de la GAPDH du pneumocoque, et ne peuvent donc pas participer à une interaction avec C1q. Cependant, sachant que C1q tend à

reconnaitre des ligands chargés, nous avons identifiés plusieurs résidus correspondants à ces peptides, exposés en surface, chargés ou polaires, pouvant être impliqués dans la reconnaissance de la GAPDH par C1q (Figure III-26). Ces résidus sont dans le peptide 12 les lysines 115, 116 et 128 ainsi que l'aspartate 126. Dans le peptide 16 la glutamine 164 et l'asparagine 166 sont exposées en surface, la lysine 161 et l'aspartate 165 sont également exposés mais forment un pont salin, ce qui rend peu probable leur implication dans une interaction avec C1q. Enfin dans le peptide 31 la lysine 304 a également été identifiée comme un résidu potentiellement impliqué dans l'interaction. Tous les résidus identifiés sont exposés sur la face du dimère opposée à la zone d'interaction avec l'autre dimère.

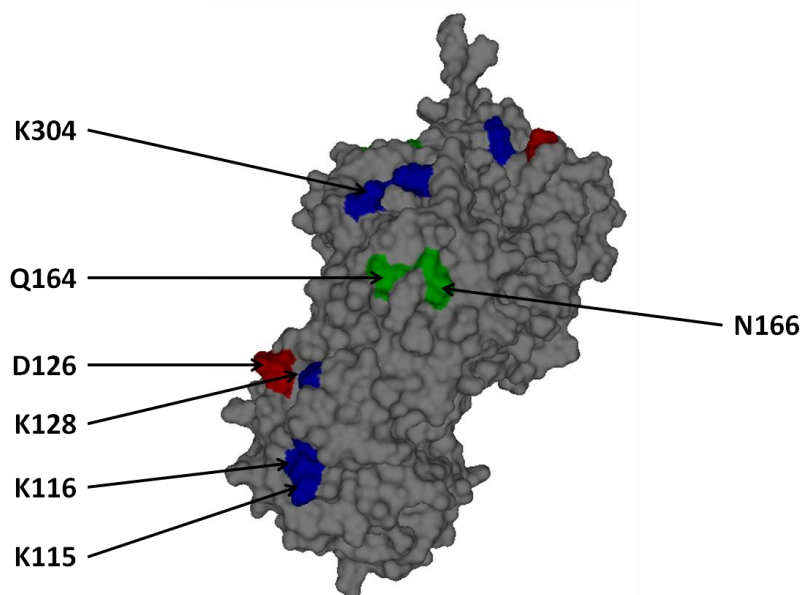


Figure III-26 : Résidus présents en surface de la GAPDH Spn potentiellement impliqués dans l'interaction avec C1q

Représentation schématique de la surface de la structure cristallographique d'un dimère de la GAPDH du pneumocoque. Les résidus acides sont représentés en rouge, les résidus basiques en bleu et les résidus polaires en vert.

III-iii-3-c- Implication des résidus identifiés dans l'interaction GAPDH-C1q

Pour déterminer si les résidus identifiés précédemment sont impliqués dans la reconnaissance de la GAPDH du pneumocoque par C1q, une approche par mutagenèse dirigée a été employée afin de muter en sérine ou en alanine les résidus concernés. Les doubles mutants K115S/K116S, D126A/K128A, Q164A/N166A et le simple mutant K304A ont été produits et purifiés de manière recombinante de la même manière que la protéine native. L'interaction de ces mutants avec C1q, comparés à la GAPDH recombinante, a été étudiée grâce à un test d'interaction en phase solide. Les résultats obtenus jusqu'à maintenant

ne permettent pas de mettre en évidence une diminution significative et reproductible du niveau de fixation à C1q de l'un des mutants (Figure III-27).

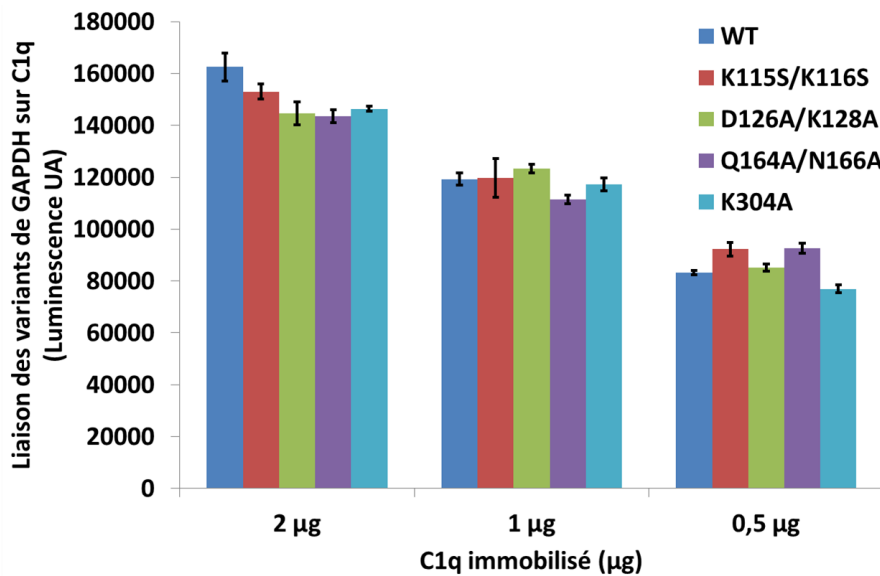


Figure III-27 : Les mutants de GAPDH_{Spn} ne diffèrent pas dans leur liaison à C1q

Le C1q ou la gélatine ont été immobilisés en plaque 96 puits (0,5 ; 1 ; 2 µg/puits). La fixation de la GAPDH du pneumocoque native ou des différents mutants (1 µg), a été mesurée en utilisant un anticorps anti-GAPDH_{Spn}. Les valeurs de luminescence brutes, après soustraction du contrôle Gélatine, sont présentées (exprimées en Unité Arbitraire). Une expérience représentative est présentée, les données montrées représentent la valeur moyenne ± E.S. des triplicats.

III-iii-4- Déterminants structuraux de l'interaction GAPDH *Spn*-plasminogène

Dans la mesure où une stratégie était mise en place pour tenter de déterminer quels sont les sites de liaison de C1q sur la GAPDH du pneumocoque, nous avons appliqué les mêmes outils à l'étude de l'interaction GAPDH-plasminogène.

La stratégie de « peptide mapping » a ainsi été utilisée pour identifier des peptides candidats comme sites de fixation du plasminogène sur la GAPDH du pneumocoque. La quantification des Dot blot obtenus a montré que le plasminogène se fixe sur les peptides 12, 13, 15, 18 et 31 (Figure III-28). Afin de confirmer ces interactions, nous avons testé la capacité des peptides à inhiber la fixation de la GAPDH au plasminogène lors d'un test d'interaction en phase solide. Les résultats de ces expériences montrent que parmi les 33 peptides, seuls les peptides 12 et 31 entrent en compétition avec la GAPDH pour la fixation du plasminogène dans les conditions du test (Figure III-29).

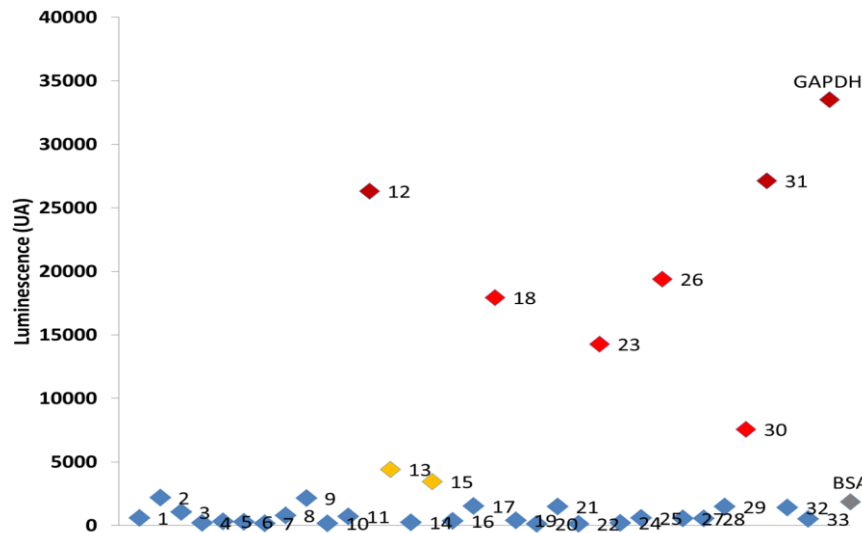


Figure III-28 : Reconnaissance de peptides de la GAPDH Spn par le plasminogène

10 µg de chaque peptide synthétique, de GAPDH ou de BSA ont été immobilisés sur membrane de nitrocellulose puis incubés avec une solution contenant 10µ/mL de C1q. La fixation de Plg a été détectée à l'aide d'un anticorps de lapin anti-Plg et d'un anticorps secondaires anti-lapin couplés à la HRP. La fixation des anticorps a été révélée par chimiluminescence (ECL, Pierce). La quantification à l'aide du logiciel ImageJ d'un Dot blot représentatif est présentée, les valeurs sont données en unités arbitraires (UA) de luminescence. Bleu : fixation de C1q ne différant pas significativement du contrôle BSA, orange : faible fixation de C1q, rouge : forte fixation de C1q.

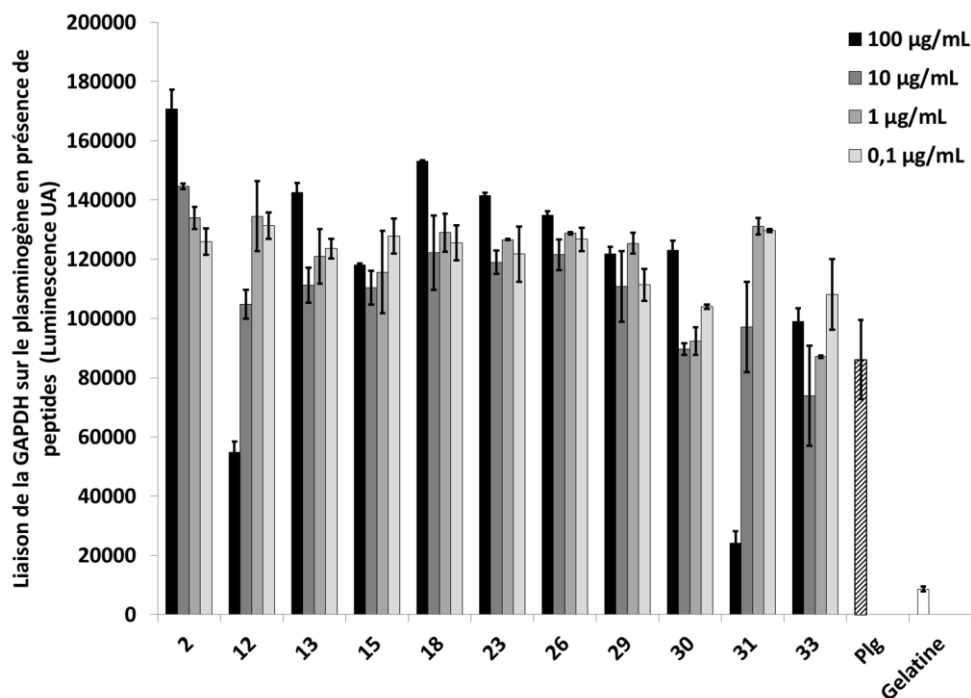


Figure III-29 : Inhibition de l'interaction GAPDH-plasminogène par les peptides

Le plasminogène ou la gelatine ont été immobilisés en plaque 96 puits (1 µg/puits). Après saturation, Le Plg a été incubé avec différentes concentrations de chaque paptides (0,1 ; 1 ; 10 ; 100 µg/mL). 1 µg de GAPDH du pneumocoque a ensuite été ajoutée dans chaque puits. La fixation de la GAPDH a été mesurée en utilisant un anticorps anti-GAPDHSpn. Les valeurs de luminescence brutes sont présentées (exprimées en Unité Arbitraire) Une expérience représentative est présentée, les données montrées représentent la valeur moyenne ± E.S. des triplicats.

Les mutants de la GAPDH du pneumocoque, construits pour tenter de mettre en évidence l'implication de certains résidus dans l'interaction GAPDH-C1q, ont également été testés pour leur interaction avec le plasminogène. La fixation de la GAPDH recombinante et des mutants à différentes quantités de Plg immobilisé a ainsi été mesurée (Figure III-30). Le mutant D126A/K128A n'a pas été intégré à ces tests car sa construction n'était pas terminée quand ces tests ont été réalisés. Les résultats obtenus montrent que le simple mutant K304A est le seul à présenter de manière reproductible un niveau d'interaction significativement réduit (-26%) avec le plasminogène. Cette inhibition partielle suggère que d'autres résidus sont probablement impliqués dans la fixation du plasminogène.

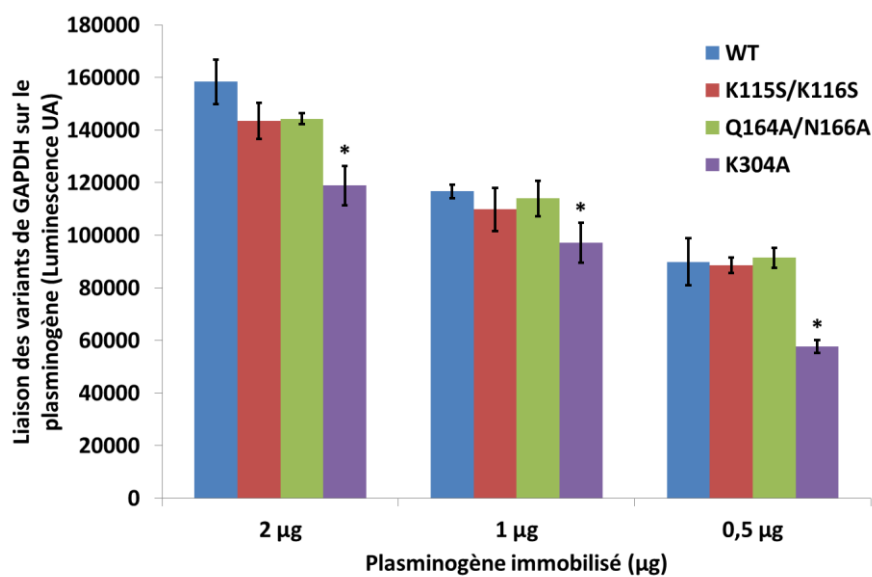


Figure III-30 : impact des mutations sur la fixation de la GAPDH au plasminogène

Le plasminogène ou la gelatine ont été immobilisés en plaque 96 puits (0,5 ; 1 ; 2 µg/puits). La fixation de la GAPDH du pneumocoque native ou des différents mutants (1 µg), a été mesurée en utilisant un anticorps anti-GAPDHSpn. Les valeurs de luminescence brutes, après soustraction du contrôle Gélatine, sont présentées (exprimées en Unité Arbitraire) Une expérience représentative est présentée, les données montrées représentent la valeur moyenne \pm E.S. des triplicats. Les variations statistiquement significatives (déterminé par ANOVA, $p \leq 0,05$) sont indiqués par *.

III-iv- Discussion

Avant le travail présenté ici, le seul ligand connu de la GAPDH du pneumocoque en termes de fonction « moonlighting » était le plasminogène. L'idée que la GAPDH du pneumocoque, à l'instar d'autres GAPDH bactériennes, puisse avoir d'autres fonctions que celle de recrutement du plasminogène, nous a conduit à chercher d'autres ligands.

III-iv-1- La GAPDH présente en surface des cellules humaines est un nouveau ligand de C1q

L'un des principaux déclencheur à l'origine de cette étude a été notre collaboration avec Philippe Frachet (IBS, groupe IRPAS), qui considérait la GAPDH humaine comme un ligand de C1q. Les résultats obtenus par nos collaborateurs montrent que les têtes globulaires de C1q (C1qGR) se fixent à une protéine d'environ 36 kDa associée aux membranes des cellules apoptotiques et identifiée par séquençage N-terminal comme étant la GAPDH.

Les expériences de co-localisations réalisées montrent que la fixation de C1qGR n'est détectée que sur les cellules apoptotiques (Figure III-2 D et N), tandis que le C1q entier se fixe aux cellules viables et apoptotiques (Figure III-2 I et S). La fixation de C1q aux cellules viables peut être due à la reconnaissance des parties collagènes de C1q par des récepteurs cellulaires. La superposition des images d'immunofluorescence de la GAPDH humaine et de C1q ou C1qGR montre une importante co-localisation (attestée par un fort coefficient de corrélation) au niveau des « bulles » de surface des cellules apoptotiques (Figure III-2 O et T), ce qui renforce l'interprétation que la GAPDH humaine est un ligand de C1q en surface des cellules apoptotiques.

III-iv-2- Etude biochimique des interactions GAPDH Spn et Hsa-C1q

La GAPDH du pneumocoque étant un homologue de la GAPDH humaine (identité de séquence d'environ 50%), nous avons cherché à vérifier par une approche *in vitro* si les deux protéines étaient reconnues par C1q.

Lors de tests d'interaction en phase solide sur C1q immobilisé, nous avons pu montrer que la GAPDH humaine et la GAPDH du pneumocoque interagissent avec C1q *in vitro*. L'incubation de quantités croissantes de GAPDH avec C1q montre une liaison dose-réponse significative des GAPDH au C1q (Figure III-3 A). De manière intéressante, le contrôle réalisé

dans les mêmes conditions avec le plasminogène, connu pour interagir avec la GAPDH du pneumocoque [358], montre également une interaction dose-réponse de la GAPDH humaine avec le plasminogène (Figure III-3 B). Dans le travail réalisé par Bergmann qui a originalement montré l'interaction de la GAPDH du pneumocoque avec le plasminogène, les auteurs suggèrent qu'à l'instar de l'énolase les lysines de la partie C-terminales de la GAPDH sont responsables de la fixation du plasminogène. Cependant le motif FAKIAK présent en C-terminal de la GAPDH du pneumocoque n'est pas retrouvé chez la GAPDH humaine (MASKE) qui fixe elle aussi le plasminogène. Ces résultats laissent à penser que bien que les lysines terminales de la GAPDH du pneumocoque puissent être impliquées dans la liaison au plasminogène, il est possible que d'autres résidus soient, comme chez l'énolase, également impliqués dans cette interaction.

L'interaction des GAPDH recombinantes avec C1q a été confirmée par une approche de pontage chimique en solution suivie d'une analyse par Western blot ainsi que par microscopie électronique à transmission (Figure III-5 C et D). Les images obtenues montrent que les GAPDH semblent interagir en solution avec les têtes globulaires de C1q, l'organisation des complexes observés plaçant les GAPDH aux extrémités de la structure en bouquet de tulipes de C1q, là où sont localisées les têtes globulaires.

Nous avons par la suite caractérisé les interactions entre les GAPDH recombinantes et C1q par des expériences de résonance plasmonique de surface. En collaboration avec le groupe IRPAS, qui accueille la plateforme de résonance plasmonique de surface de l'IBS (sous la responsabilité de Nicole Thielens), les interactions ont été étudiées en utilisant un appareil Biacore 3000. Des interactions stables et de forte affinité ont ainsi été mises en évidence entre les GAPDH et C1q (K_D GAPDH Spn = 0,34 nM, K_D GAPDH Hsa = 2,17 nM), la comparaison des taux d'association et de dissociation montre que la GAPDH du pneumocoque forme avec C1q un complexe plus stable que la GAPDH humaine. Ces résultats indiquent donc que le ou les sites de fixation de C1q diffèrent en partie entre les deux GAPDH. Les deux GAPDH interagissent également avec les têtes globulaires de C1q dans des conditions expérimentales identiques (Figure III-4 C et D). Les résultats obtenus confirment la différence d'affinité de C1q pour les deux GAPDH, le complexe formé avec C1qGR étant plus stable dans le cas de la GAPDH du pneumocoque.

Les expériences de résonance plasmonique de surface ayant permis de caractériser les interactions ont été réalisées avec les protéines recombinantes présentant toujours l'étiquette

polyhistidine utilisée pour leur purification. Nous avons donc vérifié que l'étiquette polyhistidine n'interfère pas dans la reconnaissance des GAPDH par C1q en comparant par Biacore la fixation à C1qGR d'une GAPDH humaine commerciale et de notre GAPDH humaine recombinante. Les résultats obtenus ne montrent pas de différences significatives en termes d'affinité, ce qui permet d'exclure une implication de l'étiquette polyhistidine dans les interactions avec C1q.

III-iv-3- Implication de la GAPDH de surface dans la reconnaissance du pneumocoque par C1q

Un problème difficilement solvable lors de l'étude de l'importance de la localisation en surface de la GAPDH sur ses fonctions « moonlighting » est qu'il s'avère souvent impossible de générer des mutants de délétion. En effet chez les streptocoques la glycolyse est la seule voie métabolique permettant l'assimilation des sucres, rendant essentielles les enzymes qui y sont impliquées. Une solution ingénieuse à ce problème a été apportée par l'équipe de Pancholi qui a remplacé le gène chromosomique *gapd*, codant la GAPDH chez *S. pyogenes*, par un gène codant la même GAPDH, fonctionnelle mais avec 12 résidus hydrophobes supplémentaires en position C-terminale. L'addition de cette queue hydrophobe avait pour objectif d'empêcher l'export de la GAPDH en l'ancrant à la membrane du côté cytoplasmique. L'absence d'activité GAPDH de surface du mutant *gapd-HBtail* et la localisation par immunofluorescence ont montré l'efficacité de cette approche, bien que la GAPDH soit en fait retenue dans le cytoplasme et non à la membrane [447]. La croissance de ce mutant en culture est normale mais il est en revanche déficient pour le recrutement du plasminogène, présente une adhérence réduite aux cellules Detroit 562 et perd totalement son activité antiphagocytaire [447].

Nous avons appliqué cette approche au pneumocoque dans les souches R6 (non-capsulée) et D39 (capsulée). Les souches mutantes obtenues ont été caractérisées et les résultats obtenus montrent que la quantité de GAPDH associée à la surface bactérienne est significativement réduite chez les mutants comparés aux souches sauvages. Ces résultats confirment l'intérêt de cette approche de fusion de queue hydrophobe, qui permet de réduire l'export de GAPDH vers la surface du pneumocoque d'environ 50%.

L'effet de la diminution de l'export de la GAPDH a par la suite été étudié par des tests d'interactions en phase solide avec C1q ou le plasminogène immobilisés. Les résultats obtenus montrent que la fixation des mutants R6-HBt et D39-HBt sur C1q est en moyenne

réduite d'environ 50% (Figure III-7 A et C), un résultat en accord avec la réduction de la quantité de GAPDH présente à la surface de ces mutants et qui confirme l'implication de la GAPDH de surface dans la reconnaissance du pneumocoque par C1q. La fixation de C1q en surface du pneumocoque, indépendamment de la présence d'autres effecteur solubles de l'immunité, avait déjà été mise en évidence dans des modèles d'infection [142]. Nos résultats font cependant de la GAPDH le premier ligand protéique présent en surface d'une bactérie pathogène directement reconnu par C1q.

Dans les tests d'interaction avec le plasminogène, les mutants R6-HBt et D39-HBt présentent des comportements légèrement différents. L'interaction du mutant R6-HBt avec le plasminogène est réduite de 40%, tandis que son interaction avec C1q est diminuée de 50%, une différence qui s'explique probablement par la présence d'autres récepteurs du plasminogène en surface du pneumocoque tels que l'énolase ou CbpE [354, 357]. La diminution beaucoup plus importante de la fixation du mutant D39-HBt au plasminogène (-70%), dont l'interaction avec C1q est, comme chez R6-HBt, réduite de 50%, pourrait quant à elle être imputée à la présence de la capsule. Cette dernière pourrait en effet diminuer l'accessibilité de certains récepteurs du plasminogène. Cette explication laisse à penser qu'en présence de la capsule la GAPDH est un des récepteurs du plasminogène les plus accessibles en surface du pneumocoque, sans pour autant suggérer que la GAPDH interagit avec la capsule puisque la GAPDH est présente en surface de souches non capsulées.

III-iv-4- Activation du complément par la GAPDH du pneumocoque

Les résultats obtenus ayant permis de démontrer que les GAPDH humaine et du pneumocoque, présentes respectivement en surface des cellules apoptotiques et du pneumocoque, sont toutes deux reconnues par C1q, nous avons cherché à comprendre quels pouvaient être les effets de ces interactions.

Les résultats obtenus grâce à des expériences d'activation du complexe C1 et de dépôt du complément montrent que la reconnaissance directe par C1q de la GAPDH en surface du pneumocoque permet l'activation de la voie classique du complément, qui conduit au dépôt de C3b et donc à l'opsonisation de la bactérie. En revanche, la reconnaissance de la GAPDH humaine par C1q ne semble pas en mesure d'activer le complément, ce qui indique que cette protéine est bien reconnue par C1q comme appartenant au soi-altéré et ne déclenche pas une signalisation de danger. L'hypothèse que la GAPDH du pneumocoque permette l'échappement au système immunitaire par un mécanisme de mimétisme moléculaire avec la

GAPDH humaine semble donc infondée. Ces résultats amènent à s'interroger sur la manière dont C1q discrimine ces deux ligands malgré leur degré de similarité important.

Nous avons au cours de ce travail montré que la GAPDH du pneumocoque est capable d'activer le complexe C1. Ce résultat ayant été obtenu au cours de tests réalisés en solution, il apparaît qu'il n'est pas nécessaire que la GAPDH soit associée à la surface bactérienne pour activer le complément. La GAPDH du pneumocoque, à l'instar d'autres GAPDH bactériennes [441], est présente en surface de la bactérie mais est également retrouvée dans le surnageant de culture. Cette constatation nous conduit à proposer que la GAPDH libérée par le pneumocoque puisse, à l'instar de la pneumolysine [305, 306], activer le complément à distance de la bactérie, permettant ainsi de diminuer localement les concentrations des certaines protéines du complément comme C2 et C4. L'activation protéolytique de ces composants de la cascade du complément à distance de la bactérie équivaut à leur neutralisation, puisqu'il est fort probable qu'ils réagiront avec une autre protéine présente en solution bien avant de rencontrer la bactérie.

Pour aller plus loin dans notre étude nous avons également tenté de développer un test de phagocytose du pneumocoque afin d'observer l'effet des mutants HBt (résultats non montrés). Les résultats préliminaires obtenus montrent que l'incubation des pneumocoques du sérum humain normal avant leur mise en contact avec des cellules THP-1 différenciées en macrophages augmente la phagocytose des bactéries, signe de leur opsonisation par le complément. En revanche nous n'avons pas pu mettre en évidence de différences entre les souches sauvages et les mutants. Il est probable que bien que réduit, le dépôt de C3b sur les souches mutantes reste suffisant pour induire la phagocytose au même niveau que chez les souches sauvages dans les conditions de notre test. Le fait que la GAPDH reste présente en surface des souches mutantes à hauteur d'environ 50% peut être ici un élément limitant. La présence d'autres ligands de C1q en surface du pneumocoque n'est également pas à exclure.

III-iv-5- Étude structurale des interactions

Les GAPDH humaine et du pneumocoque sont toutes deux reconnus par C1q, néanmoins lors de la caractérisation biochimique de ces interactions nous avons remarqués que l'affinité de C1q pour la GAPDH du pneumocoque est plus élevée que pour la GAPDH humaine. Cela indique que bien que les deux GAPDH soient identiques à environ 50%, le ou les sites de liaison des têtes globulaires de C1q puisse être en partie différents. La comparaison des structures cristallographiques des deux GAPDH montre des disparités de charges en surface

de ces deux protéines. La GAPDH du pneumocoque présente ainsi plus de patches acides à sa surface que la GAPDH humaine, qui est globalement plus basique. L'étude de la structure des têtes globulaires de C1q montre qu'elles ont le potentiel de reconnaître de manière différente les ligands en fonction de leur charges (Figure I-11). Ainsi des résidus basiques qui pourraient participer à la reconnaissance d'un ligand chargé négativement sont présents à l'extrémité et sur la partie extérieure de la tête globulaire. Au contraire des résidus acides, potentiellement capables de reconnaître des ligands chargés positivement, sont exposés sur la face interne de la tête globulaire. Il est envisageable que la différence dans les charges de surface des GAPDH puisse expliquer leurs différences en termes d'activation du complément. La GAPDH humaine étant chargée plutôt positivement, sa reconnaissance pourrait impliquer majoritairement des résidus présents sur la partie intérieure des têtes globulaires. Au contraire l'interaction avec la GAPDH du pneumocoque, qui présente plus de charges négatives, pourrait mettre en jeu des résidus se trouvant à l'extrémité où sur la partie extérieure des têtes globulaires. Cette configuration de l'interaction pourrait ainsi être plus favorable pour l'activation du complément, l'établissement d'interactions avec de multiples ligands distants les uns des autres étant dans ces conditions plus susceptible de se produire, et donc d'induire le changement de conformation de C1q nécessaire à l'activation, tel que décrit dans le modèle établi par nos collaboratrices Nicole Thielens et Christine Gaboriaud (IBS, groupe IRPAS) [162].

Lors de notre tentative visant à identifier le ou les sites de liaison de C1q sur la GAPDH du pneumocoque nous avons, en combinant « peptide mapping » (Figure III-22 et 23) et structure cristallographique de la GAPDH, mis en évidence des résidus exposés en surface de la GAPDH potentiellement impliqués dans l'interaction avec C1q (Figure III-26). Parmi ces résidus, certains sont conservés dans la GAPDH humaine, tels que la lysine 115, l'aspartate 126 et l'asparagine 166. Parmi les autres résidus identifiés qui ne sont pas conservés, plusieurs cas sont possibles (Figure III-24). Une arginine dans la séquence de GAPDH humaine correspond à la lysine 116, il y a donc conservation de la charge positive (Figure III-24). On peut supposer que dans ce cas une interaction puisse être conservée. La glutamine 164 est remplacée par une histidine, ce qui introduit une charge positive à la place d'un résidu polaire (Figure III-24). Concernant les lysines 128 et 304 les changements sont encore plus drastiques, les résidus correspondants étant dans la GAPDH humaine respectivement une proline et un aspartate (Figure III-24). Il y a donc remplacement d'un acide aminé chargé positivement, dans un cas par un acide aminé apolaire, et dans l'autre par un acide aminé

chargé négativement. On peut supposer que des interactions établies entre les têtes globulaires de C1q et ces résidus dans la GAPDH du pneumocoque seraient absentes avec la GAPDH humaine. Cet ensemble de similarités et de différences pourrait ainsi expliquer pourquoi l'affinité de C1q est inférieure pour la GAPDH humaine, et également pourquoi seule la GAPDH du pneumocoque active le complexe C1. Cependant, la stratégie de mutagenèse dirigée utilisée pour tester l'implication de ces résidus dans l'interaction de la GAPDH du pneumocoque avec C1q n'a à ce jour donné aucun résultat concluant. Il est ainsi possible que cette interaction implique une combinaison de ces résidus et d'autres non identifiés.

Le travail réalisé pour l'étude de l'interaction GAPDH-C1q a également été mis à profit dans le cadre de l'interaction GAPDH-plasminogène. La première fonction « moonlighting » de la GAPDH du pneumocoque mise en évidence a en effet été son interaction avec le plasminogène [358]. Dans cet article les auteurs ont émis l'hypothèse que l'interaction de la GAPDH avec le plasminogène repose sur ses deux lysines terminales (332 et 335). Certains des résultats obtenus au cours de notre travail (présenté en III-iv-2) permettent cependant d'envisager l'implication d'autres résidus, comme chez l'énolase du pneumocoque dont l'interaction avec le plasminogène repose à la fois sur les résidus lysines terminaux et sur un motif interne [357, 407]. Nous avons ainsi testé plusieurs des mutants de la GAPDH pour leur interaction avec le plasminogène (Figure III-30). Seule la mutation de la lysine 304 en alanine diminue significativement la liaison de la GAPDH du pneumocoque au plasminogène, ce qui prouve que cette lysine qui n'appartient pas au motif FAKIAK C-terminal est impliquée dans le recrutement du plasminogène. Cette inhibition de l'interaction est cependant limitée, ce qui montre que d'autres résidus sont impliqués. Les deux lysines C-terminales sont évidemment les premiers candidats qui devront être testés.

III-iv-6- Reconnaissance par C1q et activation du complément, un sacrifice acceptable pour la GAPDH du pneumocoque ?

Au cours de ce travail, nous avons montré que la reconnaissance de la GAPDH de surface du pneumocoque par C1q entraîne l'activation de la voie classique du complément et conduit à l'opsonisation de la bactérie par C3b. Bien que la GAPDH permette le recrutement de plasmine qui facilite l'invasion, le pneumocoque dispose d'autres récepteurs du plasminogène. On peut donc se demander pourquoi au cours de l'évolution, la localisation en surface de la GAPDH a été conservée. Il est bien entendu possible que les mutations

permettant d'inhiber l'export ou la fixation de la GAPDH en surface rendent la protéine non fonctionnelle et n'aient donc pas pu être sélectionnées.

Il est également envisageable que les effets négatifs pour le pneumocoque de la reconnaissance de la GAPDH par C1q puissent être contrebalancés. Une étude publiée récemment a ainsi montré que la fixation de C1q à la surface du pneumocoque facilite l'adhésion et l'invasion des cellules épithéliales et endothéliales [448]. Cet effet est dû à la fixation des régions collagènes de C1q aux cellules hôtes. Il apparaît ainsi que la reconnaissance du pneumocoque par C1q peut avoir des effets positifs dans le processus d'invasion.

Nous avons pour notre part voulu déterminer si la fonction de recrutement du plasminogène de la GAPDH du pneumocoque pouvait interférer avec la reconnaissance et l'activation du complément par C1q. Les résultats que nous avons obtenus montrent que le recrutement de plasminogène par la GAPDH n'inhibe pas l'interaction avec C1q (Figure III-16 et 18) et peut même augmenter la fixation de C1q à la GAPDH (Figure III-17 et 20). Nous avons en effet observé au cours de nos expériences que C1q est capable de se fixer dans une certaine mesure au plasminogène (résultats non montrés). Nous avons également montré que lorsque le plasminogène est activé en plasmine par l'ajout de streptokinase, la fixation de C1q sur la GAPDH augmente, mais le dépôt de C4b et C3b est réduit suite à leur dégradation par la plasmine, ce qui peut participer au processus d'échappement à la phagocytose. L'existence de ce type de mécanisme d'échappement au système immunitaire inné a été montrée pour la première fois chez *Bacillus anthracis* en 2011 [449]. Ces travaux ont montré que les spores de *B. anthracis* recrutent le plasminogène grâce à des protéines « moonlighting » présentes à leur surface (énolase, EF-Tu, GroEL). Le plasminogène ainsi recruté peut être activé en plasmine par l'activateur uPA, et cette plasmine permet la dégradation du C3b déposé sur les spores. Récemment chez le pneumocoque il a été montré que le plasminogène recruté en surface par la protéine PepO pouvait également être activé par l'uPA et dégrader le C3b [356]. Ces résultats confirment donc ceux que nous avons obtenus, et indiquent que le recrutement d'activité plasmine en surface du pneumocoque peut lui permettre d'échapper à l'opsonisation par C3b. Ainsi, l'activation du complément par la reconnaissance de la GAPDH du pneumocoque par C1q semble pouvoir être contrebalancée par la capacité de recrutement d'activité plasmine de la GAPDH (et d'autres protéines). Nos résultats montrent que le recrutement de plasmine par la GAPDH augmente le dépôt de C1q, un effet qui pourrait participer au processus d'invasion dans la mesure où le C1q fixé en surface du pneumocoque

facilite l'adhésion et l'invasion des cellules de l'hôte [448]. Il serait ici intéressant d'étudier par Western blot l'intégrité du C1q recruté en présence d'activité plasmine, ainsi que sa capacité à activer les protéases C1r et C1s. Il est en effet envisageable que le C1q soit en partie dégradé par la plasmine et qu'il ne soit plus capable d'activer la voie classique du complément tout en restant fixé à la GAPDH. Cette situation présenterait le double avantage de recruter le C1q pour participer aux interactions avec les cellules hôtes et d'empêcher la fixation de complexe C1 actif.

IV- Mécanisme d'export et d'association en surface de la GAPDH du pneumocoque

IV-i- Présentation

La présence de protéines « moonlighting » se caractérisant par leurs fonctions multiples et autonomes a été mise en évidence chez diverses bactéries. Dans la plupart des cas les fonctions « moonlighting » de ces protéines cytoplasmiques sont liées à une localisation à la surface bactérienne. La glycolyse est une source importante de protéines « moonlighting », et il a été montré pour diverses enzymes glycolytiques des capacités d'interaction avec différentes protéines de l'hôte [450].

La GAPDH est une enzyme impliquée dans la glycolyse, dont la présence en surface du pneumocoque a été démontrée [358]. La GAPDH de surface du pneumocoque participe au recrutement de la plasmine, un mécanisme qui facilite l'invasion des tissus de l'hôte [358, 361]. Nous avons également montré que la GAPDH de surface peut participer à l'échappement au système immunitaire, l'activité plasmine empêchant l'opsonisation par C3b.

Bien que de nombreuses protéines « moonlighting » bactériennes aient été caractérisées, nos connaissances concernant les mécanismes par lesquels elles transitent depuis le cytoplasme vers le milieu extracellulaire ou la surface bactérienne sont actuellement très limitées. De même, peu de données sont disponibles en ce qui concerne les structures permettant le recrutement à la surface bactérienne de ces protéines.

Au cours de ce travail nous avons donc cherché à élucider le mécanisme d'export de la GAPDH du pneumocoque. Ayant exclu les mécanismes de sécrétion actifs généralement impliqués dans l'export de protéines, nous avons utilisé des approches biochimiques et génétiques pour déterminer si la GAPDH pouvait être relarguée par la lyse bactérienne au cours de la croissance. Nous avons par la suite utilisé des approches biochimiques pour déterminer quels composants de la paroi bactérienne pouvaient permettre le recrutement de la GAPDH en surface du pneumocoque.

IV-ii- Article n°2

Streptococcus pneumoniae GAPDH is released by cell lysis and
interacts with peptidoglycan

Rémi Terrasse^{1,2,3}, Ana Amoroso⁴, Thierry Vernet^{1,2,3}, Anne Marie Di Guilmi^{1,2,3*}

¹Univ. Grenoble Alpes, IBS, F-38027 Grenoble, France, ²CNRS, IBS, F-38027 Grenoble, France and ³CEA, IBS, F-38027 Grenoble France, Institut de Biologie Structurale, Pneumococcus Group.

⁴Centre for Protein Engineering, Department of Life Sciences, University of Liege, Belgium

*Running title: Pneumococcal GAPDH binds peptidoglycan

Corresponding author : Dr Anne-Marie Di Guilmi, Pneumococcus group (PG), Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1, France. Tel.: +33 4 38 78 56 34. E-mail : anne-marie.di-guilmi@ibs.fr

Abstract

The pneumococcal GAPDH is a surface-exposed glycolytic enzyme, displaying moonlighting activities on bacterial invasion and host immune system modulation. Release of conserved cytoplasmic proteins is widely spread among Gram-positive and Gram-negative bacteria. However, pneumococcal GAPDH, like others moonlighting proteins, do not contain N-terminal signal peptide which impairs its secretion through active secretion systems (Sec, Tat). It does not either contain any membrane or cell wall anchoring signal. Thus, the mechanisms leading to GAPDH export and binding to the pneumococcal surface had not been deciphered yet. In this work, we addressed the role of the major pneumococcal autolysin LytA in the delivery process of GAPDH to the cell surface. The amount of surface-associated GAPDH was shown to be markedly reduced on the R6 Δ lytA strain, and on the R6 wild-type strain grown in presence of 1% Cho, both condition displaying reduced cell lysis phenotypes. Those results indicate that the presence of GAPDH at the surface of pneumococcal cells depends on the LytA-mediated lysis of a fraction of the cell population. Moreover, we showed that pneumococcal GAPDH binds to the bacterial cell wall independently of the presence of the teichoic acids component, indicating that GAPDH interacts with peptidoglycan in order to associate to the pneumococcal surface.

Introduction

Streptococcus pneumoniae is an important human pathogen that causes respiratory tract infections like pneumonia and sinusitis and invasive diseases such as septicemia and meningitis. This bacterium is responsible worldwide for the death of around 1 million children under 5 years of age every year (O'Brien, 2009).

Numbers of proteins exposed on the *S. pneumoniae* surface act as virulence factors, which contribute in bacterial adhesion to human tissues, in innate immune recognition and evasion and in regulating bacterial metabolism to adapt environmental changes (Koppe, Yesilkaya, Kadioglu). Beside the secreted or membrane-anchored protein associated with N-terminal signal peptide, three major groups of cell-surface proteins have been identified. Some proteins are covalently linked to the peptide moiety of the peptidoglycan by dedicated transpeptidase sortase enzymes, which recognize the LPxTG sorting motif. Lipoproteins are anchored to the membrane phospholipids through the N-terminus LxxC motif recognized by the signal peptidase II. Lastly, the choline-binding proteins (Cbps) are non-covalently associated to the phosphorylcholine (PCho) residues that decorate the (lipo)teichoic acid polysaccharides present in the cell wall. These latter proteins are uniquely present in *S. pneumoniae* and to a lesser extent in a subset of Streptococcus species of the Mitis group, *i.e.*, *S. mitis* and *S. oralis* (Frolet, Madhour).

Despite the absence of signal peptide, a pool of proteins has been shown to be located at the surface of eukaryotic and prokaryotic cells. Surprisingly, many of these proteins are highly conserved like metabolic enzymes or molecular chaperones and harbor additional biological activities when located at such unusual place, leading to their qualification as moonlighting proteins (Henderson and Martin, 2011). An increasing number of glycolytic enzymes have been described to behave as moonlighting proteins, including aldolase, triose-phosphate isomerase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and enolase (Henderson and Martin, 2011). The pneumococcus displays a large set of surface moonlighting proteins involved in the glycolytic pathway and in protein synthesis (Ling, 2004). A number of them, including GAPDH are antigenic in children and adults; antibodies elicited by recombinant GAPDH inoculation were also shown to confer protection to respiratory challenge in mouse inoculated with virulent pneumococci (Ling, 2004).

Besides the well-characterized glycolytic function of GAPDH, this protein displays multiple functions in eukaryotic and prokaryotic cells, like membrane fusion, transcriptional co-activation, DNA repair, apoptosis induction and regulation, transferrin binding and bacterial virulence (Henderson, Sirover 2005, Tarze, Raje, Sirover 1997). In a number of

pathogenic bacteria, including the pneumococcus, surface-exposed GAPDH binds plasminogen. Conversion of plasminogen to proteolytically-active plasmin plays important roles in pathological processes, like the escape from blood clots and innate immune system, tissue invasion and cell adherence (Attali, Bergamann 2007, Agarwal). We recently described a novel function of GAPDH. We showed that the pneumococcal and human GAPDHs are ligands for C1q, a key component of the classical complement pathway of the innate immune system (Terrasse, 2012). Despite high similarity in the binding properties of both GAPDHs with human C1q, only the pneumococcal GAPDH activates the complement cascade (Terrasse, 2012). These data shed new insights on the role of GAPDH in modulating the host immune response.

Moonlighting proteins are involved in bacterial virulence in a wide range of pathogens like *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *Clostridium pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Mycoplasma genitalium* and almost all Streptococci (Henderson and Martin, 2011). These biological functions are carried out at the bacterial surface and raise the question of their mode of access to the cell surface. The absence of peptide signal sequences excludes active secretion through the SecA and Tat machineries can not be considered. In this work, we used the pneumococcal GAPDH as a moonlighting protein prototype to address the question of the export process. Our data support an autolysin LytA-mediated lysis of *S. pneumoniae* in the release of GAPDH prior to binding to the peptidoglycan.

Materials and Methods

Pneumococcal growth conditions

Pneumococcal strains were grown at 37°C with 5% CO₂ in Todd Hewitt (TH) broth or in chemically defined C-medium supplemented with 0.1% yeast extract (CY). Whenever required, 1% Choline chloride (Cho) was added to the culture media. To monitor growth curves, cells were placed into multiwell plates within a Fluostar instrument (Optima; BMG) at 37°C where the absorbance at 600 nm was recorded.

Production and purification of recombinant GAPDH proteins

The construction of the clones encoding the human (Hsa) and pneumococcal (Spn) GAPDH proteins fused to a His₆-tag at the N-terminus has been described previously (Terrasse 2012). Overnight cultures of the *Escherichia coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL (Stratagene) strain transformed with the expression constructs were used for inoculation with 500 ml of Terrific Broth medium (Euromedex) supplemented with 100 µg/ml of ampicillin and cultured at 37°C for 3 h. Protein expression was induced with 0.5mM isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside for 16 h at 15°C. After sonication and centrifugation of the lysate (20 min, 40,000 x g), recombinant GAPDHs were recovered from the soluble fraction and loaded onto a 1-ml prepacked HisTrap HP column (GE Healthcare). Column equilibration buffer was 50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 20 mM imidazole (pH 8.0). After extensive washing, His-tagged GAPDHs were eluted with 60, 100, 300 and 500 mM imidazole steps in 50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl (pH 8.0) buffer and subsequently dialyzed against 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂ (pH 7.4) before use for biological assays. The degree of protein purity was checked by Coomassie Blue staining of SDS-polyacrylamide gels. Protein concentrations were determined by absorbance at 280 nm. Pneumococcal GAPDH was FITC-labelled by adding 40 µL of FITC (1 mg/mL) in 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂ (pH 7.4) to 100 µL of purified GAPDH (6 mg/mL), the incubation lasted for 4 h at 4°C. The protein solution was then extensively dialyzed against 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂ (pH 7.4) to remove free FITC.

Quantification of pneumococcal surface-exposed GAPDH

The amount of surface-exposed pneumococcal GAPDH was analyzed by an alkaline elution strategy (Terrasse 2012). Briefly, a 50-ml culture in late-exponential growth phase (OD₆₀₀ ≈ 0.6) was harvested by centrifugation (15 min, 3,000 x g). The cells were resuspended in PBS

to adjust the bacterial suspension to 3, 6, 15, 30, 45 and 60 Absorbance Unit (OD₆₀₀) in 100 µl of 100 mM carbonate (pH 10) buffer and incubated for 30 min at 37°C. The suspensions were centrifuged, the supernatants collected, separated by SDS-PAGE, transferred on a nitrocellulose membrane and analyzed by Western blot using rabbit anti-pneumococcal GAPDH antibody (1:5,000 dilution), horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (1:5,000 dilution, Sigma Aldrich) and ECL (Pierce) as detection reagent. The intensity of the spots was quantified using the ImageJ software. The amount of GAPDH in each sample was determined related to the GAPDH released by the wild-type strain, used at the highest concentration, and this value was arbitrarily considered as 100%. Whenever required, CbpE and FtsZ were detected using polyclonal rabbit antibodies.

Microscopy techniques

Pneumococcal strains were grown in CY or in CY supplemented with 1% Cho until at an OD₆₀₀ of 0.3. The cells were resuspended in PBS, transferred to microscope slides and phase contrast fields were observed. After incubation with FITC-labeled GAPDH, sacculi suspensions were washed and deposited on microscope slides. Slides were observed using an Olympus BX61 optical microscope equipped with a UPFLN 100× O-2PH/1.3 objective and a QImaging Retiga-SRV 1394 cooled charge-coupled device camera. Image acquisition was performed using the Volocity software package and processed with Adobe Photoshop 6.0.

Isolation of pneumococcal cell wall

Cell wall purification from *S. pneumoniae* R6 was adapted according to Bui *et al.*, 2012. Briefly, a 2 L culture in TH was incubated at 30°C until OD₆₀₀ of 0.5. Cells were harvested by centrifugation for 10 min at 4°C at 7,500 g and resuspended in 40 ml of ice-cold 50 mM Tris pH 7.0. The cell suspension was poured dropwise into 150 ml of boiling 5% sodium dodecyl sulfate (SDS) solution and boiled for another 30 min. Cell debris were pelleted by centrifugation at 20°C for 20 min at 40,000 g. The pellet was washed twice with 25 ml of 1 M NaCl at 20°C for 30 min and repeatedly with water until it was free of SDS (Hayashi, 1975). All centrifugation steps were performed at 40,000 g. The pellet was resuspended in 20 ml of buffer containing 100 mM Tris pH 7.5, 20 mM MgSO₄, DNase A (10 µg/ml) and RNase I (50 µg/ml). The incubation was performed for 2 h at 37°C with gentle shaking before addition of 10 mM CaCl₂ (final concentration) and trypsin (100 µg/ml). The incubation was pursued for 18 h at 37°C with gentle shaking. Proteases were inactivated with addition of SDS (1% final

concentration) and incubation for 15 min at 80°C. The cell wall preparation was recovered by ultracentrifugation for 30 min at 200,000 g at 25°C, resuspended in 20 ml of 8 M LiCl, and incubated for 15 min at 37°C. After another ultracentrifugation step, the pellet was resuspended in 25 ml of 10 mM EDTA pH 7.0 and incubated at 37°C for 1 h. The cell wall was washed with water before being resuspended in 2 ml of water and conserved at 4°C. Additional hydrofluoric acid treatment of the cell wall removed the teichoic acids by hydrolysis of the phosphate group attached to position 6 of the N-acetylmuramic acid.

Cell wall solid-phase binding assay

Solid-phase binding assay was performed to measure binding of the pneumococcal GAPDH to purified sacculi containing the peptidoglycan (PG) and the teichoic acids (TA) components, or to a sacculi preparation in which TA have been removed after fluoridric treatment (PG). Purified LTA from *S. pneumoniae* was purchased from Statens Serum Institute (Denmark) and human CRP from Calbiochem (236608). White 96-well microtiter plates (Greiner Bio One) were coated in triplicates with 100 µg of the different polysaccharides reagents. Saturation was performed by adding 200 µl of PBS-0.2% gelatin per well for 1 h at RT. Three washes were performed using 200 µl of PBS. A volume of 100 µl of GAPDH and CRP at 10 µg/ml was added to each well, and the mixture was incubated for 2 h at room temperature. Three washes were performed using 200 µl of PBS-0.2% Tween 20. Bound proteins were detected by adding 100 µl of mouse anti-His tag and goat anti-CRP antibodies coupled to horseradish peroxidase (1:1,000 dilution) in PBS-0.02% Tween 20-0.02% gelatin for 2 h at room temperature. After three washes with PBS-0.2% Tween-20, ECL solution (Pierce) (100 µl) was added to each well and chemiluminescence was measured using a multiwell luminescence reader (Fluostar Optima; BMG).

FITC-labelled proteins binding assay

Five mg of sacculi were resuspended with 50 µl of each FITC-labelled proteins at 1 mg/ml in 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂ (pH 7.4) and incubated for 1 h at room temperature. Sacculi were centrifuged (5 min at 20,000 g), supernatants were removed and the pellets were resuspended in 1 mL of 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂ (pH 7.4). This washing step was repeated five times. The sacculi pellets were finally resuspended in 50 µL of 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂ (pH 7.4) and transferred into a black 96-well microtiter plate (Greiner Bio One). Bound proteins were detected by fluorescence measurements (Fluostar Optima; BMG). Each experiment was performed in duplicate.

Cell wall pull-down binding assay

Purified Hsa and pneumococcal GAPDH proteins (10 µg/ml) were incubated with purified *S. pneumoniae* cell wall containing both PG and TA components (5 mg) in 50 µl of 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂ (pH 7.4) for 16 h at 4°C. After centrifugation (5 min at 5,000 g), the supernatant was removed (flow through) and the cell wall pellet was washed three times and resuspended in 50 µl Laemmli buffer. After an incubation at 100°C for 10 min and a centrifugation step (3 min at 5,000 g), the supernatant fraction, corresponding to the bound protein fraction, was recovered from the cell wall pellet. Load, flow-through, wash and bound fractions were analyzed by SDS-PAGE subjected to Western blotting using HRP-conjugated anti-His tag monoclonal antibody diluted 1:10 000 before detection with a chemiluminescent substrate (ECL; Thermo Scientific Pierce).

Pneumococcal subcellular fractionation

The amount of pneumococcal GAPDH in the cell wall compartment of the R6 wild-type strain grown in CY or in CY supplemented with 1% Cho and of the *lytA* mutant in CY was analyzed by cell fractionation. One-tenth of a 100-ml culture in late exponential growth phase ($OD_{600} \approx 0.6$) was centrifuged (15 min at 3,000 x g), and the pellet was resuspended in 1 ml of PBS containing 100 µg/ml lysozyme and 50 U/ml mutanolysin and incubated for 2 h at 37°C. The different lysate samples were submitted to SDS-PAGE and stained by Coomassie blue. The total amount of proteins in each sample was quantified using the ImageJ software in order to correct, if necessary, the equivalent loads of the cell wall fractions prepared as follows. The remaining 90 ml were centrifuged (15 min, 3,000 x g), the pellet was resuspended in 9 ml of PBS containing 100 µg/ml lysozyme, 50 U/ml mutanolysin, 30% sucrose and incubated for 2 h at 37°C. This lysate was centrifuged and the supernatant containing the cell wall was collected. The cell wall fractions were separated by SDS-PAGE, transferred on a nitrocellulose membrane and analyzed by Western blot using rabbit anti-pneumococcal GAPDH antibody (1:5,000 dilution), horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (1:5,000 dilution, Sigma Aldrich) and ECL (Pierce) as detection reagent. The intensity of the spots was quantified using the ImageJ software.

RESULTS

The GAPDH export is dependent on LytA-mediated cell lysis

We addressed the role of the Cbps in the delivery process of GAPDH to the cell surface since the major autolysin LytA, a member of the Cbp family is involved in pneumococcal lysis. Addition of 1% choline in the culture medium induced the release of Cbps from the cell surface by competition with the PCho residues associated to the TA moieties. In these growth conditions, pneumococcal cells adopt a chaining morphology, most probably because of the release of LytB, a glucosaminidase involved in cell separation (Fig 1A). The addition of PCho also reduces cell lysis to a level comparable to the one observed with the *lytA* mutant strain, likely the consequence of the release of LytA from the cell surface (Fig 1B). The quantity of protein associated to the pneumococcal surface was evaluated by alkaline elution as described previously (Terrasse 2012). The efficiency of Cbps release by addition of choline in growth medium was exemplified with CbpE (Fig 1C). We further checked that this procedure did not induce artifactual cell lysis since almost no FtsZ, a cytoplasmic protein involved in cell division, was observed in the eluate fractions when compared with the level of GAPDH, whatever the genetic background (wild-type or *lytA* mutant) or growth conditions (presence of 1% Cho) (Fig 1C).

Using this strategy, the amount of GAPDH associated to the cell surface of the R6 wild-type and *lytA* strains, and of the R6 wild-type strain grown in presence of 1% Cho was quantified. The amount of GAPDH was decreased by 65% when R6 cells were cultured in the presence of 1% Cho and by 70% in Δ *lytA* strain when compared to the wild-type strain (Fig 2A). The quantity of GAPDH associated to the cell wall was also evaluated after subcellular fractionation. As expected, the amount of GAPDH was decreased in the Δ *lytA* mutant strain and the wild-type strain grown in presence of 1% Cho by 60 % and 80%, respectively, when compared to the wild-type strain grown in CY (Fig 2B). Altogether, these data show that the presence of GAPDH at the surface of pneumococcal cells depends on the LytA-mediated lysis of a fraction of the cell population.

Association of GAPDH to the pneumococcal cell wall

Purified recombinant GAPDH-FITC labeled was incubated with pneumococci sacculi and protein binding was analyzed by measuring the fluorescence associated to the cell wall. Non-related proteins such as BSA, GST and SOS-GFP fusion were also FITC-labeled and used as negative controls in this assay (Fig 3A). GAPDH displayed a four to five fold higher level of

cell wall binding when compared to control proteins (Fig 3A). Images of GAPDH-FITC bound to pneumococcal sacculi are shown (Fig 3B). The sacculi conserved the ovococcal shape and were all decorated by GAPDH-FITC. We checked that sacculi-labeling was not due to free FITC molecules. Finally, pull-down assays were performed with the same sacculi preparation using 10 μ g of recombinant human and pneumococcal GAPDH proteins. Comparing the level of bound proteins shows that a greater amount of the bacterial GAPDH was associated to the cell wall when compared with the human GAPDH (Fig 3C, PD lanes).

The pneumococcal GAPDH binds to the peptidoglycan component of the cell wall

Apart from the capsule, the major polysaccharide components of the pneumococcal cell wall are the peptidoglycan (PG) and teichoic acids (TA), the latter are either membrane or peptidoglycan-anchored. In order to investigate the peptidoglycan and teichoic acids respective contribution to GAPDH binding, we used isolated pneumococcal cell wall preparations containing or not the teichoic acids species. As shown in Fig. 4, purified GAPDH interacts with peptidoglycan independently on the presence of the teichoic acids components. Using synthetic lipoteichoic acids (LTA), no GAPDH binding could be detected. CRP is a well-known protein of the innate immune system, which recognizes the PCho linked on teichoic acids moieties. It was used in this experiment as an archetypal ligand for TA to ensure that the PG cell wall preparation was indeed free from detectables traces of TA. These data indicate that the ligand of GAPDH at the surface of the pneumococcus is the peptidoglycan.

DISCUSSION

Release of conserved cytoplasmic proteins is widely spread among Gram-positive and Gram-negative bacteria. Indeed, proteomic analysis have identified glycolytic enzymes, chaperones and translation factors in culture supernatant samples of *Listeria* and *E. coli* species (Trost 2005, Xia 2008), *S. aureus* (Pasztor 2010) as well as in cell wall enriched fractions as for *S. pneumoniae* (Ling 2004).

Pneumococcal GAPDH, like others moonlighting proteins do not contain N-terminal signal peptide, which impairs its active secretion through the Sec system. The twin-arginine translocation export pathway is absent in *S. pneumoniae*, which excludes the use of this system to export moonlighting proteins. The accessory secretion machinery SecA2, required for the secretion of a family of large serine-rich glycosylated proteins in Streptococci and *Staphylococcus aureus* (Lizcano 2012) has been shown to be involved in the secretion of cytoplasmic proteins like the superoxide dismutase A in *M. tuberculosis* (Braunstein 2003) and autolytic enzyme in *L. monocytogenes* (Lenz 2003). So far, the SecA2 pathway has not been associated to the export of GAPDH proteins. Indeed, more extracellular GAPDH was detected in *S. agalactiae* *secA2* mutant as compared to the wild-type strain (Oliviera 2012). In *S. pneumoniae*, the SecA2 pathway is present in a number of strains but absent in the D39 strain and its uncapsulated derivative strain R6. Since the latter strain was used throughout this study, the universal role of the SecA2 pathway in secretion of moonlighting proteins in the pneumococcus can be excluded.

The alternative mode of protein export would be induced by cell lysis. Lysis of *S. agalactiae* cells mediated by detergent membrane solubilisation or cell wall synthesis inhibition through the action of β -lactam antibiotics led to tens-fold increase of GAPDH associated to the cell surface (Oliviera 2012). Autolysis is a well-studied phenomenon observed when bacterial cultures reach stationary phase and is mediated by amidases, which cleave the bond between the *N*-acetylmuramic and the L-alanine residues of the peptidoglycan. The *S. aureus* major autolysin Atl has been shown to play a role in excretion of GAPDH since almost no protein was detected in the supernatant of *atl* mutant compared to the wild-type strain, while in a *tagO* mutant, which harbors an increased cell lysis profile, the amount of GAPDH in the supernatant was higher than in the wild-type strain (Pasztor 2010).

We observed comparable effects in pneumococcal cells deleted from the major autolysin LytA. Higher quantity of GAPDH was detected at the surface the wild-type strain when compared to the mutant strain. Experiments in this work have been performed using bacterial cultures in exponential phase growth. While most of LytA is cytoplasmic, and despite the

absence of signal peptide, a fraction of LytA is present in the extracellular medium and attached to the cell wall when bacterial culture reaches the stationary phase. Lower amounts are also detected during the exponential phase probably due to fratricidal lysis or cell turnover (Mellroth 2012). These observations are in accordance with our data showing that GAPDH is released to the extracellular space during exponential phase growth and that this release is dependent on the presence of LytA.

In *S. aureus*, the abundance of proteins in the cytoplasm and their release into the supernatant are not correlated, opening the question about a possible regulation of the cytoplasmic proteins excretion (Pasztor 2010). To date, although some data could suggest such process, not much is known. It was shown that automodification of *E. coli* enolase by covalent binding of its substrate 2-phosphoglycerate affects the enzymatic activity and correlates to protein export (Boël 2004). A decreased active form of the *L. monocytogenes* superoxide dismutase was observed upon serine/threonine phosphorylation and the most active, nonphosphorylated form was preferentially secreted via the SecA2 pathway (Archambaud 2006). More generally, bacterial glycolytic enzymes, like enolase and GAPDH are commonly detected in phosphoproteomic analysis but the physiological role of this post-translational modification and its role in the extracellular export has not been widely investigated yet (Sun 2010).

Bergmann and Hammerschmidt were among the first to proposed that moonlighting proteins could associate to the cell surface after release from the cytoplasm following their studies on pneumococcal enolase (Bergmann 2001). It was indeed shown that *Lactococcus crispatus* enolase and GAPDH bind to LTA (Antikainen 2007). Recently, the binding of *S. agalactiae* GAPDH to the bacterial surface was demonstrated by adding recombinant purified GAPDH to heat-inactivated and lived bacterial cells and to the surface of unrelated bacterial species, indicating that the surface ligand would be common to many bacteria species (Oliviera 2012). Our data bring supplemental information since we showed that the pneumococcal GAPDH binds to the peptidoglycan, a universal component of the bacterial cell wall.

References

- Agarwal V, Hammerschmidt S, Malm S, Bergmann S, Riesbeck K, Blom AM. (2012) Enolase of *Streptococcus pneumoniae* binds human complement inhibitor C4b-binding protein and contributes to complement evasion. *J Immunol.* 189, 3575-3584.
- Agarwal V, Kuchipudi A, Fulde M, Riesbeck K, Bergmann S, Blom AM. (2013) *Streptococcus pneumoniae* endopeptidase O (PepO) is a multifunctional plasminogen- and fibronectin-binding protein, facilitating evasion of innate immunity and invasion of host cells. *J Biol Chem.* 2013, 288, 6849-6863
- Anel Lizcano A., Sanchez C. J. and Orihuela C. J. (2012) A role for glycosylated Serine-rich repeat proteins in Gram-positive bacterial pathogenesis. *Mol Oral Microbiol*, 27, 257–269.
- Antikainen J., Kupannen V., Lähtenmäki K. and Timo K. Korhonen T. K. (2007). pH-Dependent Association of Enolase and Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase of *Lactobacillus crispatus* with the Cell Wall and Lipoteichoic Acids. *J. Bacteriol.* 189, 4539-4543.
- Archambaud C., Nahori M.-A., Pizarro-Cerda J., Cossart P. and Dussurget O. (2006). Control of *Listeria* superoxide dismutase by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 281, 31812-31822
- Attali, C., C. Durmort, T. Vernet, and A. M. Di Guilmi. 2008. The interaction of *Streptococcus pneumoniae* with plasmin mediates transmigration across endothelial and epithelial monolayers by intercellular junction cleavage. *Infect Immun* 76:5350-5356.
- Bergmann S., Rohde M., Chhatwal G. S. and Hammerschmidt S. (2001). Alpha-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Mol. Microbiol.* 40, 1273-1287.
- Bergmann S, Hammerschmidt S. (2007) Fibrinolysis and host response in bacterial infections. *Thromb Haemost.* 3, 512-520.
- Boël G., Pichereau V., Mijakovic I., Mazé A., Poncet S., Gillet S., Giard J.-C., Hartke A., Auffray Y., Deutscher J. (2004). Is 2-Phosphoglycerate-dependent automodification of bacterial enolases implicated in their export ?, *J. Mol. Biol.*, 337, 485-496
- Braunstein M., Espinosa B. J., Chan J., Belisle J. T. and Jacobs W. R. (2003) SecA2 functions in the secretion of superoxide dismutase A and in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.*, 48, 453-464
- Frolet C., Beniazza M., Roux L., Gallet B., Noirclerc-Savoie M., Vernet T. Di Guilmi A.M. (2010) New adhesin functions of surface-exposed pneumococcal proteins. *BMC Microbiology*, 10, 190

- Henderson, B., and Martin, A. (2011) Bacterial virulence in the moonlight: multitasking bacterial moonlighting proteins are virulence determinants in infectious disease. *Infect Immun* 79, 3476-3491
- Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. (2008) The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol.* 4, 288-301.
- Koppe U, Suttorp N, Opitz B. (2012). Recognition of *Streptococcus pneumoniae* by the innate immune system. *Cell Microbiol.* 14, 460-466.
- Lenz L.L., Mohammadi S., Geissler A. and Portnoy D.A. (2003) SecA2-dependent secretion of autolytic enzymes promotes *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 12432-12437.
- Ling E, Feldman G, Portnoi M, Dagan R, Overweg K, Mulholland F, Chalifa-Caspi V, Wells J, Mizrahi-Nebenzahl Y. (2004) Glycolytic enzymes associated with the cell surface of *Streptococcus pneumoniae* are antigenic in humans and elicit protective immune responses in the mouse. *Clin Exp Immunol.* 2, 290-298.
- Madhour A, Maurer P, Hakenbeck R. (2011) Cell surface proteins in *S. pneumoniae*, *S. mitis* and *S. oralis*. *Iran J Microbiol.* 2, 58-67.
- Mellroth P., Daniels R., Eberhardt A., Rönnlund D. Blom H., Widengren J., Normark S. and Henriques-Normark B. (2012) LytA, major autolysin of *Streptococcus pneumoniae*, requires access to nascent peptidoglycan. *J. Biol. Chem.*, 287,11018-11029.
- O'Brien, K. L., Wolfson, L. J., Watt, J. P., Henkle, E., Deloria-Knoll, M., McCall, N., Lee, E., Mulholland, K., Levine, O. S., and Cherian, T. (2009) Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet* 374, 893-902
- Oliveira L., Madureira P., Andrade E.-B., Bouaboud A., Morello E., Ferreira P., Poyart C., Trieu-Cuot P., Dramsi S. (2012) Group B Streptococcus GAPDH is released upon cell lysis, associates with bacterial surface, and induces apoptosis in murine macrophages. *PlosOne*, 7, e29963.
- Pasztor L., Ziebandt A.-K., Nega M., Schlag M., Haase S., Franz-Wachtel M., Madlung J., Nordheim A., Heinrichs D.E. and Götz F. (2010) Staphylococcal Major Autolysin (Atl) Is Involved in Excretion of Cytoplasmic Proteins. *J Biol Chem*, 285, 36794-36803.
- Raje, C. I., S. Kumar, A. Harle, J. S. Nanda, and M. Raje. 2007. The macrophage cell surface glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a novel transferrin receptor. *J Biol Chem* 282:3252-3261.

- Sirover, M. A. (1997). Role of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in normal cell function and in cell pathology. *J Cell Biochem* 66:133-140.
- Sirover MA. (2005) New nuclear functions of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in mammalian cells. *J Cell Biochem.* 95, 45-52.
- Sun, X., Ge, F., Xiao, C.L., Yin, X.F., Ge, R., Zhang, L.H., and He, Q.Y. (2010) Phosphoproteomic analysis reveals the multiple roles of phosphorylation in pathogenic bacterium *Streptococcus pneumoniae*. *J Proteome Res* 9: 275–282.
- Tarze, A., A. Deniaud, M. Le Bras, E. Maillier, D. Molle, N. Larochette, N. Zamzami, G. Jan, G. Kroemer, and C. Brenner. 2007. GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization. *Oncogene* 26:2606-2620.
- Terrasse, R. Tacnet-Delorme P., Moriscot C., Pérard J., Schoehn G., Vernet T., Thielens N., Di Guilmi A.M. and Frachet P. (2012) Human and pneumococcal cell surface glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) proteins are both ligands of human C1q protein. *J. Biol. Chem.*, 287, 42620-42633.
- Trost M., Wehmhöner D., Kärst U., Dieterich G., Wehland J. and Jänsch L. (2005) Comparative proteome analysis of secretory proteins from pathogenic and non-pathogenic *Listeria* species. *Proteomics.* 5, 1544–1557
- Xia X.-X., Mee-Jung Han, Sang Yup Lee and Jong-Shin Yoo. (2008) Comparison of the extracellular proteomes of *Escherichia coli* B and K-12 strains during high cell density cultivation. *Proteomics,* 8, 2089–2103
- Yesilkaya H, Andisi VF, Andrew PW, Bijlsma JJ. (2013) *Streptococcus pneumoniae* and reactive oxygen species: an unusual approach to living with radicals. *Trends Microbiol.* 21, 187-195.

Acknowledgements

R.T. was supported by a PhD grant from the Rhône-Alpes region, Cluster Infectiologie. This work was partly supported by ANR grant PiliPath (ANR11BSV800501). We thank Dr Christophe Grangeasse for providing the *lytA* mutant strain and Céline Lafaye for the SOS-GFP protein.

Figure legends

Figure 1. Removal of Choline-Binding Proteins inhibits pneumococcal autolysis

(A) Phase contrast views of the R6 wild-type strain cultured in CY (left panel) and in CY supplemented with 1% Cho (right panel). Scale bars, 10 μ m.

(B) Growth profiles of the R6 wild-type strain in CY and CY + 1% Cho and of the *lytA* mutant in CY media.

(C) Bacterial suspensions of the R6 wild-type strain in CY and CY + 1% Cho and the *lytA* mutant in CY were treated by alkaline pH in order to release surface from the bacterial surface. Proteins were detected in the eluate supernatants by Western blot using appropriate polyclonal antibodies. Upper panel: detection of CbpE in alkaline eluates from bacterial suspensions of increasing cell densities, 3, 6, 15, 30, 45, 60 AU (OD_{600}). Lower panels: detection of FtsZ and GAPDH in alkaline eluates of cell suspensions corresponding to 45 AU. Equivalent amount of loading material was calculated based on OD values and gel scanning quantification and not on CFU measurements since chaining morphology induced by the presence of 1 % Cho alters colony counting (Weiser 2011).

Figure 2. Pneumococcal lysis induced by LytA promotes GAPDH surface localization

Quantification of pneumococcal GAPDH associated with the bacterial surface in the R6 wild-type strain grown in CY and CY + 1% Cho and the *lytA* mutant in CY. Bacterial suspensions were prepared at 45 AU (OD_{600}) and treated by alkaline pH in order to release GAPDH from the bacterial surface. Presence of GAPDH in the eluate samples was detected by Western blot and quantification of the chemiluminescent signals was performed. The ratios were calculated in respect of the parental strain. The average of three independent experiments is shown \pm S.D. Equivalent amount of loading material was calculated based on OD values and gel scanning quantification and not on CFU measurements since chaining morphology induced by the presence of 1 % Cho alters colony counting (Weiser 2011).

(A) Amount of GAPDH associated to the cell surface

(B) Amount of GAPDH associated to the cell wall fraction after sub-cellular fractionation

Figure 3. GAPDH binds to the cell wall

(A) Solid-phase binding of FITC-labeled proteins to pneumococci cell wall sacculi.

(B) Microscopic images of FITC-labeled GAPDH bound to pneumococci cell wall sacculi. Control with FITC-containing buffer dialyzed in the same conditions as the protein is shown. Phase contrast (PC), fluorescence and merge pictures are shown. Scale bars, 5 μ m.

(C) Pull down of the human (Hsa) and pneumococcal (Spn) GAPDH proteins with pneumococcal cell wall. The load (L) protein was mixed with the insoluble cell wall preparation and compared with the flow-through (F) fraction. After extensive wash (W), protein bound to the cell wall pellet was eluted with Laemmli buffer at 100°C for 10 min (PD). The protein samples were analyzed by Western blot using an anti-His tag serum.

Figure 4. GAPDH binds to the peptidoglycan component of the cell wall

The cell wall suspension containing either PG and TA or only PG and purified LTA (100 μ g) were coated on 96-well plate. GAPDH and CRP proteins were added. After extensive washes, bound proteins were immunodetected using specific sera. Chemiluminescence was measured after extensive washes and expressed as arbitrary units. Each assay was performed three times in triplicate wells. A representative experiment of the interaction of at least 3 independent experiments is shown.

Figure 1.

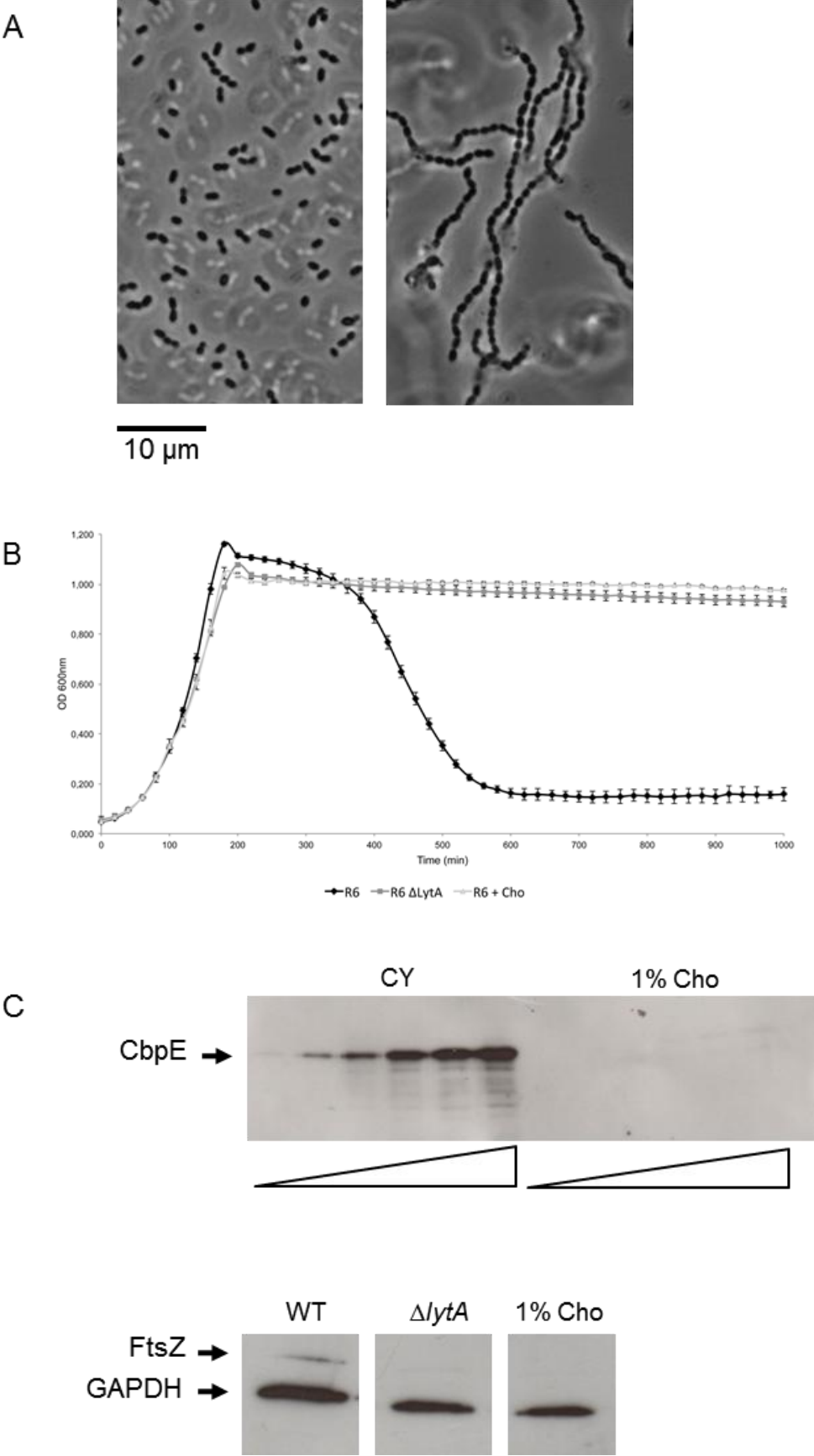


Figure 2.

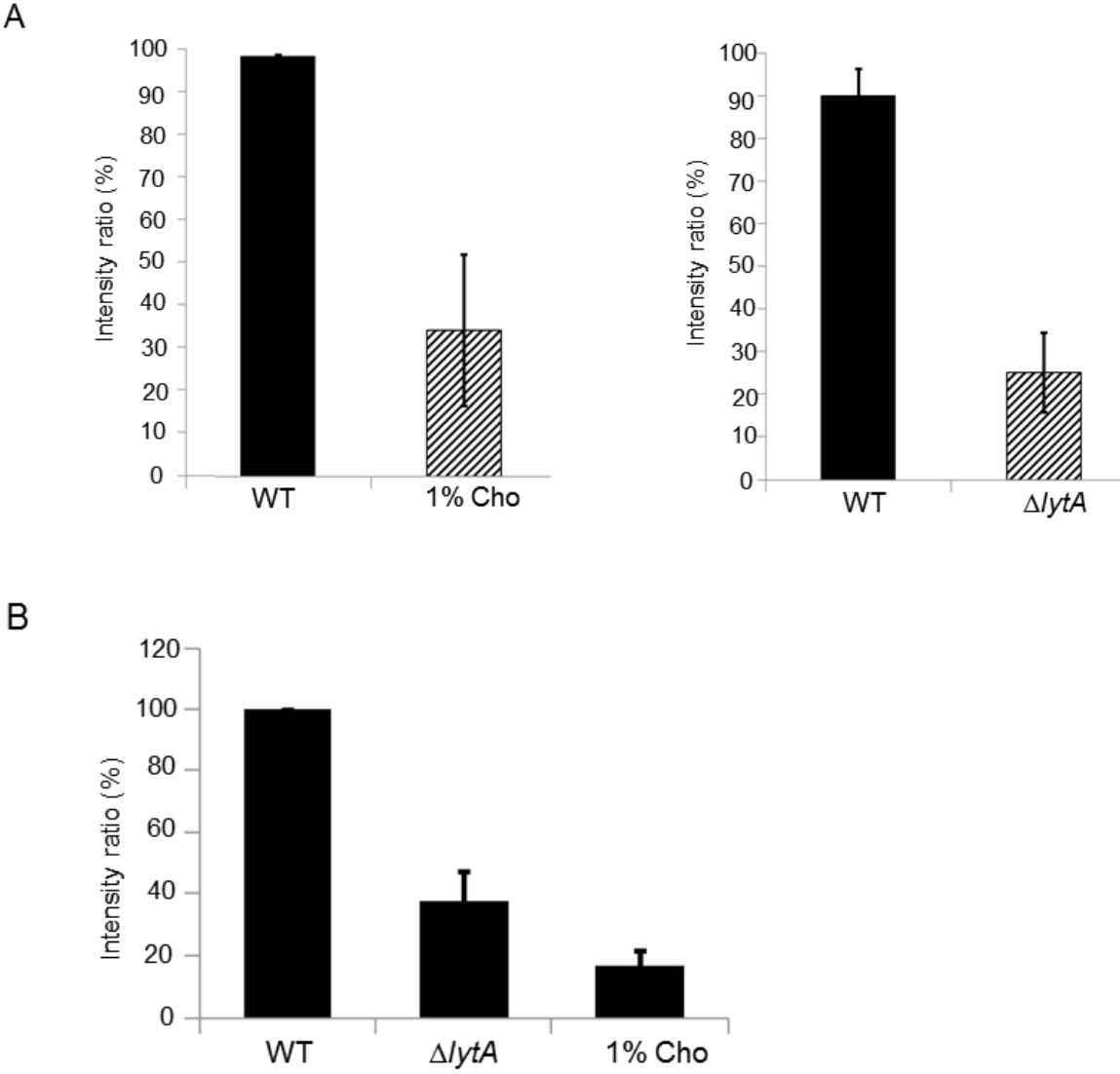


Figure 3.

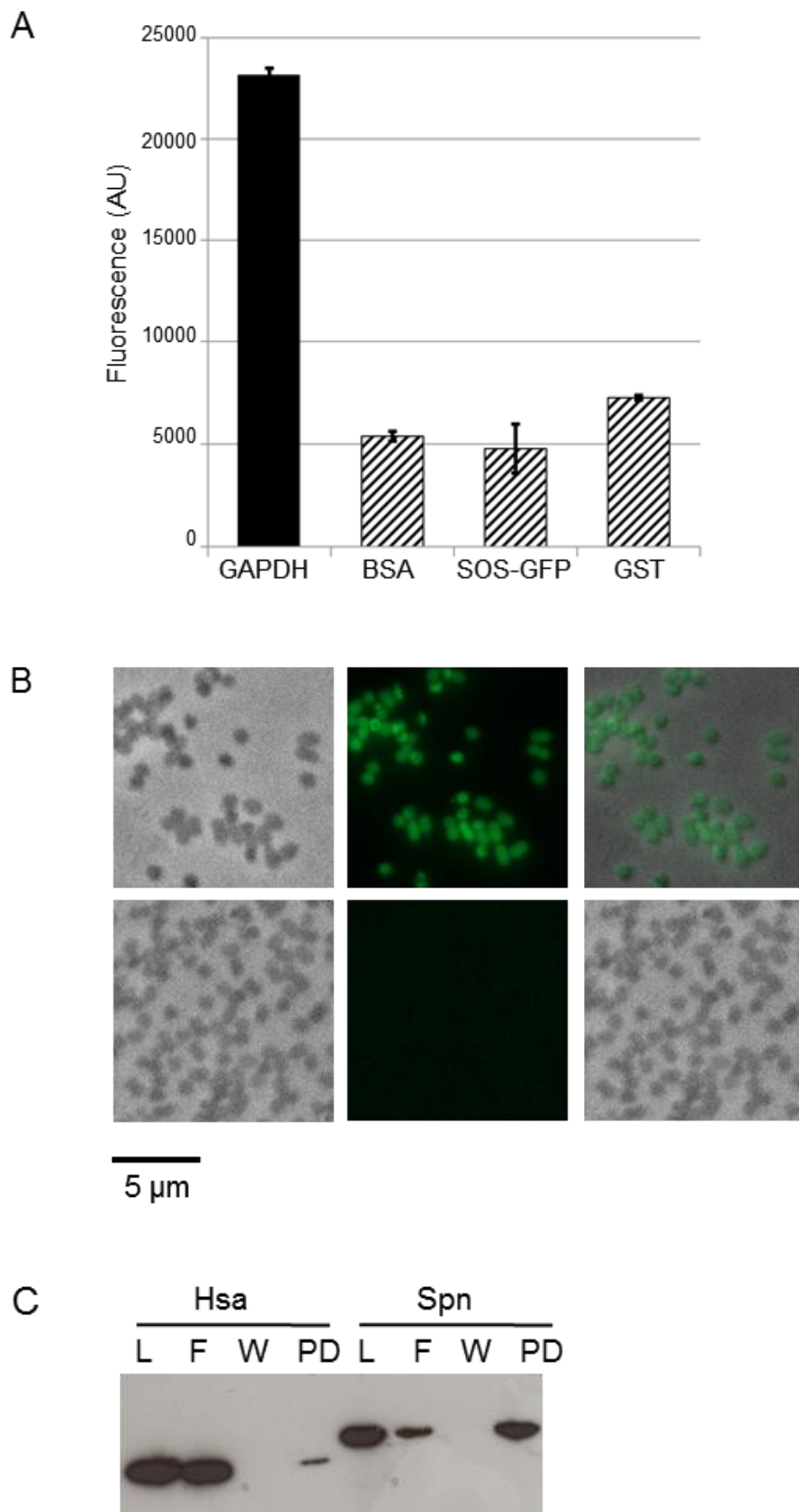
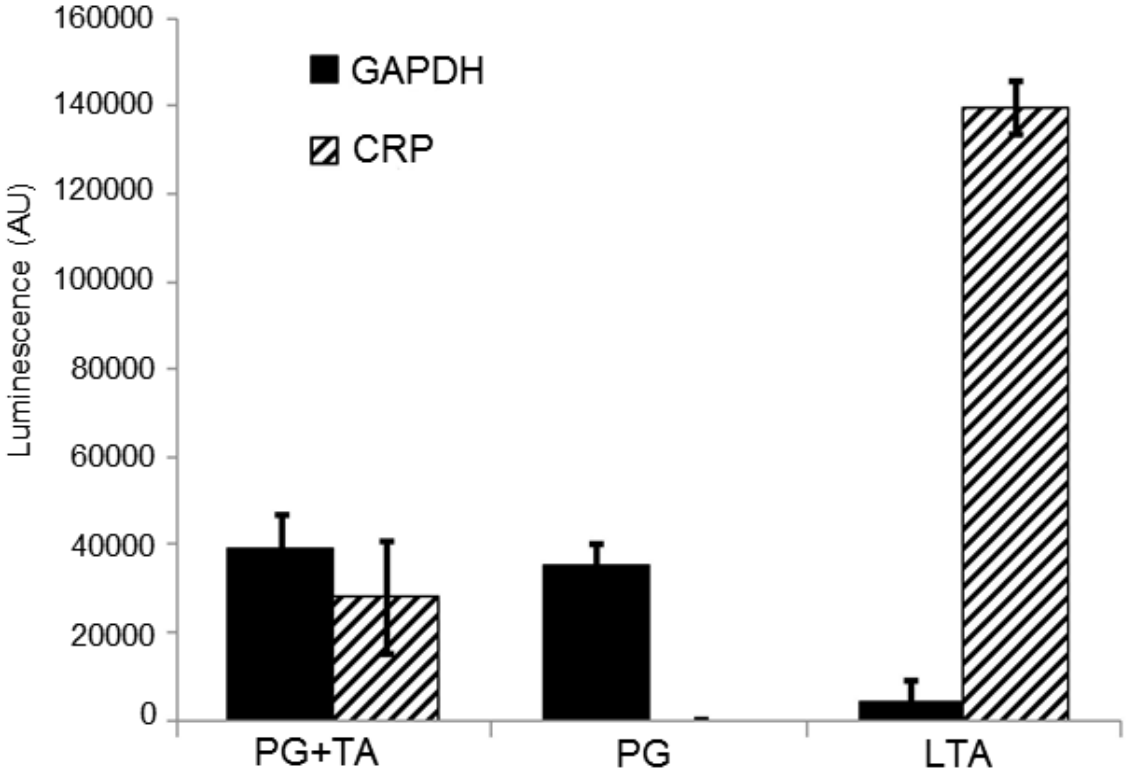


Figure 4.



IV-iii- Discussion

Des preuves de la présence de la GAPDH en surface de *S. pneumoniae* ont été apportées simultanément par deux équipes en 2004 [358, 444]. Il a été montré que la GAPDH de surface du pneumocoque participe au recrutement de plasminogène / plasmine par la bactérie [358], un processus qui facilite la migration de la bactérie à travers la matrice extracellulaire et la pénétration des épithélia et endothélia [361]. Nous avons montré, au cours du travail présenté précédemment, que la présence de la GAPDH en surface du pneumocoque permet sa reconnaissance par le collagène de défense C1q, et que cette interaction active le complément [451]. Nous avons également mis en évidence que le recrutement de plasmine par la GAPDH permet d'empêcher l'opsonisation par C3b grâce à l'activité protéolytique de la plasmine, tout en conservant la fixation de C1q qui facilite l'invasion.

La GAPDH apparaît donc comme un facteur de virulence important pour le pneumocoque, il n'avait cependant jusqu'à maintenant jamais été expliqué comment la GAPDH est exportée vers la surface de la bactérie, ni avec quelle structure de surface elle pouvait interagir.

IV-iii-1- Export de la GAPDH par lyse

Comme présenté précédemment (I-viii-2-b), la sécrétion de protéines est souvent due à des machineries de translocation reconnaissant un peptide signal située à l'extrémité N-terminale de la protéine devant être sécrétée, comme les voies SecA, SecA2 et TAT. Les protéines « moonlighting » étant dépourvues de peptide signal, elles ne peuvent généralement pas être transportées via ces systèmes de sécrétion.

Le transport par un système de sécrétion actif semblant donc être exclue, nous avons cherché un mécanisme alternatif permettant la libération de la GAPDH du pneumocoque. Nous nous sommes ainsi penchés sur le rôle des hydrolases du peptidoglycane, et plus particulièrement de la principale autolysine LytA, qui est impliquée dans la lyse du pneumocoque. La plupart des hydrolases, dont LytA, étant des CBP, l'ajout de choline dans le milieu de culture permet l'inhibition compétitive de la fixation de ces protéines aux acides téichoïques et lipotéichoïques. Bien que des bactéries lysent durant la croissance du pneumocoque, par exemple grâce au mécanisme de fratricide, le phénomène de lyse prend de l'ampleur quand les cultures entrent en phase stationnaire et est donc particulièrement

délectable à ce moment, la population s'effondrant en quelques heures (Figure IV-1 B, R6). L'activité des hydrolases étant conditionnée par leur localisation, nous avons vérifié que le blocage de leur recrutement à la paroi inhibe la lyse du pneumocoque (Figure IV-1 B, R6 + Cho). Un résultat similaire est obtenu avec un mutant de délétion de *lytA*, ce qui confirme son rôle d'autolysine majeure du pneumocoque (Figure IV-1 B, R6 Δ LytA).

Comme dans le travail précédent, nous avons mesuré la quantité de GAPDH associée à la surface des bactéries par fractionnement cellulaire (Figure IV-2 B) et par élution des protéines de surface à pH alcalin (Figure IV-2 A). Les résultats obtenus montrent que, comparés à la souche sauvage cultivée en absence de choline, le mutant Δ *lytA* et la souche sauvage cultivée en présence de choline présentent une diminution importante de la quantité de GAPDH associée à leur surface. Ces résultats montrent que la GAPDH du pneumocoque est relarguée par la lyse de bactéries et confirment des travaux récents qui ont mis en évidence ce mécanisme chez d'autres organismes comme *S. aureus* [440] et *S. agalactiae* [441].

Nous avons vérifié que les résultats obtenus ne sont pas perturbés par une lyse artéfactuelle provoquée au cours des traitements visant à isoler les protéines de surface. La présence de FtsZ, une protéine cytoplasmique impliquée dans la division, a été recherchée par Western blot dans les fractions d'élution de protéines de surface. Comparée à la GAPDH, FtsZ est presque indétectable dans les éluats testés, quel que soit la souche et les conditions de cultures (Figure IV-1 C). FtsZ étant parfaitement détectable dans des extraits totaux comparé à la GAPDH (résultat non montré), ce résultat confirme que les différences observées entre la souche sauvage cultivée en absence de choline, le mutant Δ *lytA* et la souche sauvage cultivée en présence de choline ne sont pas dues à un artefact introduit par les manipulations.

Le travail réalisé ici utilise des bactéries en phase exponentielle de croissance, une phase durant laquelle la plus grande partie de LytA est séquestrée dans le cytoplasme, bien qu'elle soit néanmoins retrouvée en faible quantité associée à la surface du pneumocoque [452]. La quantité de LytA associée à la surface augmente drastiquement quand les pneumocoques en culture atteignent la phase stationnaire, et provoque alors l'autolyse massive des bactéries. Il est probable que la lyse en phase exponentielle de croissance, qui permet comme nous l'avons montré le relargage de la GAPDH, soit également responsable de la libération de LytA. L'hypothèse la plus plausible expliquant cette lyse en phase exponentielle est qu'elle soit due au phénomène de fratricide, qui permet aux bactéries compétentes de lyser les bactéries non-compétentes. LytA est d'ailleurs impliquée dans ce phénomène d'allolyse, avec une autre

amidase (CbpD) et le lysozyme LytC [70-73], et la délétion de *lytA* réduit significativement le fratricide [72] ce qui conforte l'interprétation selon laquelle c'est ce phénomène d'allolyse en cours de croissance qui permet la libération de la GAPDH.

IV-iii-2- Association de la GAPDH en surface du pneumocoque

Nos travaux ayant permis de montrer que la GAPDH du pneumocoque est relarguée par la lyse de bactéries, nous avons cherché à déterminer comment la GAPDH ainsi libérée peut se réassocier à la surface de la bactérie.

Des travaux précédents avaient déjà montré que la GAPDH et l'énolase de *L. crispatus* se fixent aux acides lipotéichoïques de cette bactérie [443]. Plus récemment il a été mis en évidence que la GAPDH de *S. agalactiae* est en mesure de se fixer à la surface de la bactérie vivante ou tuée par la chaleur, ainsi qu'à la surface d'autres espèces bactériennes (*S. aureus*, *S. pyogenes*, *L. lactis*) [441], ce qui suggère un mode d'attachement reposant sur la reconnaissance d'un substrat commun.

Ces précédents nous ont conduits à tester la possibilité que la GAPDH du pneumocoque interagisse avec un composant de la paroi. Nous avons isolé la paroi de pneumocoques, appelée sacculi, et montré que la GAPDH recombinante marquée au FITC se fixe à ces sacculi (Figure IV-3 A et B). Des expériences de pull-down ont également été réalisées avec ces sacculi, qui ont confirmé que la GAPDH du pneumocoque se fixe à la paroi (Figure IV-3 C). Cette expérience a également montré que la GAPDH humaine peut se fixer à la paroi du pneumocoque, mais dans des proportions moins importantes que celle du pneumocoque.

Les deux composants principaux de la paroi étant le peptidoglycane et les acides téichoïques, nous avons cherché à étudier l'implication de ces deux composants dans le recrutement de la GAPDH séparément. Pour ce faire, nous avons utilisé des sacculi dont les acides téichoïques ont été retirés par un traitement à l'acide fluorhydrique ainsi que des acides lipotéichoïques purifiés commerciaux. Nous avons montré grâce à un test d'interaction en phase solide que la GAPDH du pneumocoque se fixe aux sacculi, indépendamment de la présence des acides téichoïques, en interagissant donc avec le peptidoglycane (Figure IV-4). Ce résultat est conforté par le fait qu'aucune fixation de la GAPDH recombinante aux acides lipotéichoïques purifiés n'est détectée (Figure IV-4).

Ces résultats montrent que la GAPDH du pneumocoque est recrutée en surface de la bactérie grâce à une interaction avec le peptidoglycane, qui est un composant universel des

parois bactériennes. Nous présentons donc ici des preuves qui confortent les résultats obtenus sur la GAPDH de *S. agalactiae*, qui présente une forte homologie avec la GAPDH du pneumocoque (92% d'identité de séquence et 96% de similarité de séquence) [441]. Il est ainsi envisageable que la fixation au peptidoglycane soit, au moins chez les streptocoques, un mécanisme conservé de recrutement de la GAPDH à la surface bactérienne.

Il a précédemment été montré que la GAPDH de *L. crispatus* se fixe aux acides lipotéichoïques d'*Enterococcus hirae* et de *S. aureus*, mais pas au peptidoglycane de *S. aureus* [443]. Cette protéine présentant une homologie prononcée avec la GAPDH (57% d'identité de séquence et 70% de similarité), ce résultat peut paraître étonnant. Les résidus impliqués dans l'interaction de la GAPDH du pneumocoque avec le peptidoglycane n'étant pas identifiés, il est difficile de déterminer si les différences de séquences entre les deux protéines sont à l'origine de leurs capacités de liaison. Il convient cependant de remarquer que les acides lipotéichoïques utilisés pour tester l'interaction de la GAPDH de *L. crispatus* sont très différents de ceux de *S. pneumoniae*. Les LTA du pneumocoque présentent en effet des résidus choline et présentent de ce fait des charges positives, alors que les LTA d'*E. hirae* et *S. aureus* sont essentiellement composés de sucres. Nous avons montrés que la GAPDH du pneumocoque interagit avec le peptidoglycane qui est un polymère polysaccharidique, il est donc envisageable que la GAPDH de *L. crispatus* se fixe aux sucres des LTA d'*E. hirae* et *S. aureus*, une interaction qui pourrait être empêché pour les LTA de *S. pneumoniae* par un phénomène de répulsion électrostatique dû au résidus choline. L'absence de fixation de la GAPDH de *L. crispatus* au peptidoglycane reste cependant difficilement explicable sans une compréhension approfondie des mécanismes d'interaction de la GAPDH du pneumocoque avec le peptidoglycane.

Nous avons également montré ici que la GAPDH humaine pouvait dans une certaine mesure interagir avec la paroi du pneumocoque, bien que l'affinité de la GAPDH humaine semble plus faible que celle de la GAPDH bactérienne. Cette capacité de la paroi du pneumocoque à recruter la GAPDH humaine pourrait participer à la virulence de la bactérie. Nous avons en effet montré précédemment [451] que C1q se fixe à la GAPDH humaine mais que cette interaction n'active pas le complément, la GAPDH humaine étant apparemment reconnue par C1q comme un ligand du soi-altéré. Le recrutement de GAPDH humaine en surface du pneumocoque pourrait ainsi consommer du C1q sans induire l'activation du complément, un mécanisme qui participerait à l'échappement au système immunitaire. Il a de plus été récemment montré que le C1q fixé en surface du pneumocoque facilite l'adhésion et

l'invasion des cellules de l'hôte [448], le recrutement de GAPDH humaine pourrait donc faciliter ce processus.

V- Conclusions et perspectives

La présence de protéines cytoplasmiques « moonlighting » en surface d'agents pathogènes est décrite chez un nombre croissant d'organismes, qu'il s'agisse de bactéries, de levures, ou de protozoaires, et suscite un intérêt croissant [450, 453]. Ces protéines recrutées en surface se caractérisent par leurs fonctions multiples, indépendantes de leurs activités cytoplasmiques, qui leurs permettent souvent d'agir comme des facteurs de virulence. La GAPDH est une enzyme glycolytique dont la présence en surface du pneumocoque a été mise en évidence [358] et qui participe au recrutement de la plasmine, un mécanisme qui facilite l'invasion des tissus de l'hôte [358, 361]. Au cours de ce travail de thèse nous avons d'une part cherché à mettre en évidence de nouvelles fonctions de la GAPDH de surface du pneumocoque, en nous intéressant plus particulièrement à son rôle dans les interactions entre la bactérie et le système immunitaire de l'hôte, tout en dressant un parallèle avec la GAPDH humaine. Nous avons d'autre part entrepris de déterminer comment la GAPDH, une protéine cytoplasmique, pouvait être exportée et quelle structure pouvait permettre son association en surface de la bactérie.

Reconnaissance des GAPDH par C1q

La première partie de ce travail a porté sur la mise en évidence et la caractérisation biochimique des interactions entre les GAPDH, humaine et du pneumocoque, et C1q. Les résultats obtenus ont permis de montrer que les deux GAPDH sont bien reconnues par C1q, qui présente cependant une affinité plus forte pour la GAPDH du pneumocoque. Nous avons démontré que C1q reconnaît les GAPDH par le biais de ses têtes globulaires, à la fois en solution et immobilisées sur des surfaces *in vitro*, et *in vivo* en surface des cellules apoptotiques (pour la GAPDH humaine) ou du pneumocoque (pour la GAPDH bactérienne).

Dans le but d'approfondir notre compréhension des interactions entre les têtes globulaires de C1q et leurs ligands, nous avons entrepris d'étudier les déterminants moléculaires de l'interaction entre la GAPDH du pneumocoque et C1q. Les résultats obtenus en combinant structure cristallographique de la GAPDH, peptide mapping et mutagenèse dirigée n'ont à ce jour pas encore permis de mettre en évidence de résidus impliqués dans l'interaction. Les interactions des mutants réalisés dans le cadre de cette étude devront cependant être testées par résonance plasmonique de surface. En effet, cette méthode plus sensible et quantitative que les tests d'interaction en phase solide permettra de mieux caractériser les mutants. Les données ainsi obtenues pourraient mettre en évidence des modifications dans les paramètres cinétiques de l'interaction, signes de l'implication des résidus mutés dans la liaison à C1q. Il

est également envisageable que la reconnaissance par C1q implique de multiples résidus, des combinaisons de mutations des résidus identifiées vont donc être réalisées et testées. La comparaison des structures cristallographiques de la GAPDH humaine et de la GAPDH du pneumocoque pourraient également permettre de fournir d'autres candidats. Des expériences de co-cristallisation des GAPDH humaine et du pneumocoque avec les têtes globulaires de C1q vont également être menées en collaboration avec Christine Gaboriaud et Christophe Moreau (IBS, groupe IRPAS). Des résidus présents en surface des têtes globulaires potentiellement impliqués dans des interactions avec les GAPDH pourraient être identifiés si ces expériences portent leurs fruits. Il serait par la suite possible de tester l'implication de ces résidus dans les interactions grâce aux systèmes de production de C1q et C1qGR recombinants mis au point par Nicole Thielens et Isabelle Bally [454]. Ces systèmes récemment développés pourront être utilisés pour la réalisation de mutants de substitution des têtes globulaires de C1q, dont les interactions avec les GAPDH pourraient par la suite être testées.

La GAPDH du pneumocoque : activation du complément et échappement au système immunitaire

Les deux GAPDH étudiées étant reconnues par C1q nous avons déterminé quelles étaient les conséquences de ces interactions. En effet, comme évoqué précédemment, les cellules apoptotiques doivent être reconnues en tant que soi-altéré, leur prise en charge par le système immunitaire devant induire une réponse anti-inflammatoire et tolérogène. Au contraire, la reconnaissance d'un pathogène, comme le pneumocoque, par le système immunitaire entraîne normalement une réponse inflammatoire qui est nécessaire à son élimination. Nous avons cherché à vérifier l'hypothèse selon laquelle la GAPDH du pneumocoque présente en surface de la bactérie est un moyen utilisé par la bactérie pour se faire passer pour une cellule du soi-altéré, par mimétisme moléculaire avec la GAPDH humaine. Lors de ce travail nous avons donc évalué la capacité de C1q à activer la cascade du complément en réponse à la reconnaissance de la GAPDH humaine ou de la GAPDH du pneumocoque. Les résultats obtenus ont montré que contrairement à l'hypothèse avancée, la reconnaissance des deux GAPDH par C1q entraîne des conséquences différentes. La GAPDH du pneumocoque permet l'activation du complexe C1, ce qui n'est pas le cas de la GAPDH humaine. Cette découverte renforce l'intérêt de l'étude des déterminants moléculaires des interactions entre les GAPDH et C1q. Ces deux protéines homologues reconnues par C1q peuvent en effet servir de modèle pour la compréhension du mécanisme d'activation du complexe C1.

Nous avons par la suite confirmé grâce à l'utilisation des mutants HBt dans des tests de dépôt du complément que la reconnaissance de la GAPDH de surface du pneumocoque permet l'activation de la cascade du complément. Pour approfondir notre compréhension des conséquences sur la réponse immunitaire de la reconnaissance de la GAPDH par C1q, nous avons tenté de mettre au point un test de phagocytose du pneumocoque. Le test, toujours en développement, n'a à ce jour pas permis de mettre en évidence des différences dans les niveaux de phagocytose entre les souches sauvages et mutantes. Au-delà de la mise au point des conditions du test de phagocytose, un facteur limitant est probablement le fait qu'il reste des quantités significatives de GAPDH en surface des mutants HBt. Une activation du complément significative a toujours lieu à la surface de ces bactéries et il est possible que bien que réduit, le dépôt de C3b reste suffisant pour induire une phagocytose identique ou proche de celle des souches sauvages. Une stratégie alternative pour éviter ce problème pourrait être de remplacer au niveau chromosomique la GAPDH bactérienne par la GAPDH humaine. Une telle souche serait viable puisque l'activité GAPDH essentielle à la survie de la bactérie serait conservée, mais présenterait une GAPDH incapable d'activer le complément.

Finalement, nous avons au cours de ce travail mis en évidence que l'activation du complément induite lors de la reconnaissance de la GAPDH par C1q pouvait être contrebalancée par l'autre fonction moonlighting de la GAPDH, le recrutement de la plasmine. Nos résultats ont montré que si la GAPDH recrute de la plasmine, le dépôt de C4b et C3b est fortement réduit du fait de l'activité protéolytique de la plasmine. Nous supposons que ce mécanisme permet d'empêcher l'opsonisation de la bactérie par C3b tout en conservant la fixation du C1q, qui facilite l'adhésion et l'invasion des cellules de l'hôte [448].

Export et recrutement en surface de la GAPDH du pneumocoque

La deuxième partie de ce travail a consisté à élucider le mécanisme d'export de la GAPDH du pneumocoque, et à déterminer quelle structure permettait son recrutement à la surface bactérienne. Nos résultats ont permis de montrer que, à l'instar des GAPDH de *S. aureus* [440] et de *S. agalactiae* [441], la GAPDH du pneumocoque est relarguée par lyse bactérienne au cours de la croissance. Nous avons ainsi montré que la présence de la GAPDH en surface du pneumocoque est fortement dépendante de la présence de LytA, l'autolysine majeure du pneumocoque, qui est également impliquée dans le phénomène de fratricide. L'inhibition de l'action de la plupart des hydrolases du peptidoglycane permet également de réduire considérablement la quantité de GAPDH associée à la surface du pneumocoque.

Nous avons identifié une interaction entre la GAPDH et la paroi du pneumocoque. Parmi les deux composants principaux de la paroi, les acides téichoïques et le peptidoglycane, nous avons montré que c'est à ce dernier que la GAPDH se fixe. Les déterminants moléculaires de cette interaction sont cependant pour l'instant inconnus. Nous envisageons donc d'étudier la fixation de la GAPDH aux sacculi du pneumocoque grâce à des expériences de RMN du solide. Ceci afin de déterminer d'une part comment la protéine interagit avec le peptidoglycane, et d'autre part si l'interaction implique les chaînes polysaccharidiques du peptidoglycane ou les peptides servant à la réticulation du polymère.

Modèle d'action de la GAPDH du pneumocoque

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail et des informations présentes dans la littérature permettent finalement de proposer le modèle suivant pour les activités « moonlighting » de la GAPDH du pneumocoque (Figure V-1).

Au cours de la croissance du pneumocoque, certaines bactéries sont lysées (fratricide, bactériocines produites par des compétiteurs, défaut de croissance ou de division, action du système immunitaire, d'antibiotiques...). La GAPDH cytoplasmique de ces bactéries est relarguée lors de la lyse et s'associe à la surface des bactéries vivantes en interagissant avec le peptidoglycane. Cette GAPDH de surface permet la fixation de C1q en surface de la bactérie, qui facilite l'adhésion du pneumocoque aux cellules épithéliales et endothéliales et favorise l'invasion des tissus de l'hôte. La reconnaissance de la GAPDH par C1q permet l'activation du complément en surface de la bactérie, qui conduit au dépôt de C3b et donc à l'opsonisation du pneumocoque, ce qui conduit à la phagocytose de la bactérie. Cette activation du complément peut néanmoins être contrebalancée par le recrutement de la plasmine, une protéase à sérine de l'hôte. La GAPDH du pneumocoque est en effet capable d'interagir avec le plasminogène, le zymogène de la plasmine, et permet donc son recrutement en surface de la bactérie. En fonction des conditions locales (disponibilités des activateurs de la plasmine uPA et tPA), le plasminogène recruté en surface peut être activé en plasmine. Son activité protéolytique permet d'inhiber le dépôt de C4b et C3b sur le pneumocoque en dégradant le C3b et le C4b associés à la surface de la bactérie ainsi que le C3 et le C4 soluble. L'activité plasmine recrutée en surface de la bactérie par la GAPDH pourrait faciliter l'adhésion aux cellules épithéliales et endothéliales (en dégageant l'accès à la surface cellulaire) et l'invasion des tissus (clivage des jonctions intercellulaires).

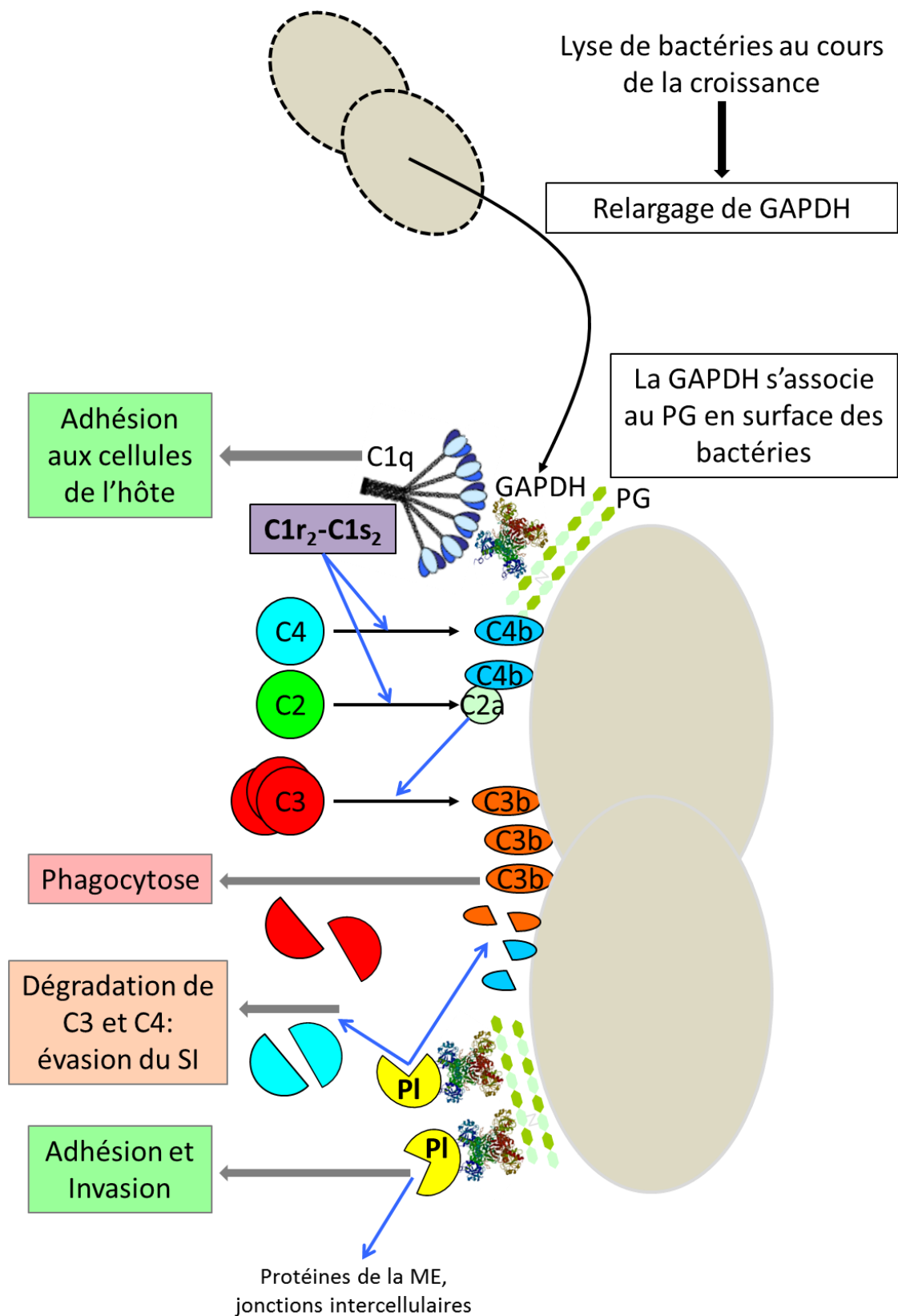


Figure V-1 : Les fonctions « moonlighting » de la GAPDH du pneumocoque

Modèle des activités « moonlighting » de la GAPDH. La couleur des encadrés représente les différentes conséquences : verts pour les fonctions favorisant le processus d'infection, rouge pour l'activation des défenses de l'hôte et orange pour l'échappement au système immunitaire. Les flèches bleues représentent les activités enzymatiques. PG : peptidoglycane, PI : plasmine

VI- Bibliographie

1. Nobbs, A.H., R.J. Lamont, and H.F. Jenkinson, *Streptococcus adherence and colonization*. Microbiol Mol Biol Rev, 2009. **73**(3): p. 407-50, Table of Contents.
2. O'Brien, K.L., et al., *Burden of disease caused by Streptococcus pneumoniae in children younger than 5 years: global estimates*. Lancet, 2009. **374**(9693): p. 893-902.
3. WHO, *The World Health Report*. 2004.
4. WHO, *Pneumococcal vaccines*. Wkly Epidemiol Record, 2003(14): p. 110-19.
5. Anevllavis, S. and D. Bouros, *Community acquired bacterial pneumonia*. Expert Opin Pharmacother, 2010. **11**(3): p. 361-74.
6. Lieberthal, A.S., et al., *The diagnosis and management of acute otitis media*. Pediatrics, 2013. **131**(3): p. e964-99.
7. Bridy-Pappas, A.E., et al., *Streptococcus pneumoniae: description of the pathogen, disease epidemiology, treatment, and prevention*. Pharmacotherapy, 2005. **25**(9): p. 1193-212.
8. Fedson, D.S. and J.A. Scott, *The burden of pneumococcal disease among adults in developed and developing countries: what is and is not known*. Vaccine, 1999. **17 Suppl 1**: p. S11-8.
9. Ryan, M.W. and P.J. Antonelli, *Pneumococcal antibiotic resistance and rates of meningitis in children*. Laryngoscope, 2000. **110**(6): p. 961-4.
10. Varon, E., C. Janor, and L. Gutmann, *Rapport d'activité du CNRP*. 2011.
11. Lynch, J.P., 3rd and G.G. Zhanel, *Streptococcus pneumoniae: epidemiology, risk factors, and strategies for prevention*. Semin Respir Crit Care Med, 2009. **30**(2): p. 189-209.
12. Kyaw, M.H., et al., *Effect of introduction of the pneumococcal conjugate vaccine on drug-resistant Streptococcus pneumoniae*. N Engl J Med, 2006. **354**(14): p. 1455-63.
13. Carvalho Mda, G., et al., *PCR-based quantitation and clonal diversity of the current prevalent invasive serogroup 6 pneumococcal serotype, 6C, in the United States in 1999 and 2006 to 2007*. J Clin Microbiol, 2009. **47**(3): p. 554-9.
14. Dorléans, F., et al., *Impact de la vaccination par le vaccin anti-pneumococcique conjugué heptavalent sur l'incidence des infections invasives à penumocoques en France*. 2010.
15. Hansman, D. and M.M. Bullen, *A Resistant Pneumococcus*. Lancet, 1967. **2**(7509): p. 264-&.
16. Appelbaum, P.C., et al., *Streptococcus pneumoniae resistant to penicillin and chloramphenicol*. Lancet, 1977. **2**(8046): p. 995-7.
17. Mera, R.M., et al., *Increasing prevalence of multidrug-resistant Streptococcus pneumoniae in the United States over a 10-year period: Alexander Project*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2005. **51**(3): p. 195-200.
18. Lynch, J.P., 3rd and G.G. Zhanel, *Streptococcus pneumoniae: does antimicrobial resistance matter?* Semin Respir Crit Care Med, 2009. **30**(2): p. 210-38.
19. Richter, S.S., et al., *Changing Epidemiology of Antimicrobial-Resistant Streptococcus pneumoniae in the United States, 2004-2005*. Clinical Infectious Diseases, 2009. **48**(3): p. E23-E33.
20. Varon, E., C. Janor, and L. Gutmann, *Rapport d'activité du CNRP*. 2010.
21. Kim, S.H., et al., *Changing trends in antimicrobial resistance and serotypes of Streptococcus pneumoniae isolates in Asian countries: an Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP) study*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(3): p. 1418-26.
22. McCool, T.L., et al., *The immune response to pneumococcal proteins during experimental human carriage*. J Exp Med, 2002. **195**(3): p. 359-65.

23. Weiser, J.N., *The pneumococcus: why a commensal misbehaves*. J Mol Med (Berl), 2010. **88**(2): p. 97-102.
24. Bogaert, D., R. De Groot, and P.W. Hermans, *Streptococcus pneumoniae colonisation: the key to pneumococcal disease*. Lancet Infect Dis, 2004. **4**(3): p. 144-54.
25. Pericone, C.D., et al., *Inhibitory and bactericidal effects of hydrogen peroxide production by Streptococcus pneumoniae on other inhabitants of the upper respiratory tract*. Infect Immun, 2000. **68**(7): p. 3990-7.
26. Regev-Yochay, G., et al., *SpxB is a suicide gene of Streptococcus pneumoniae and confers a selective advantage in an in vivo competitive colonization model*. J Bacteriol, 2007. **189**(18): p. 6532-9.
27. Margolis, E., *Hydrogen peroxide-mediated interference competition by Streptococcus pneumoniae has no significant effect on Staphylococcus aureus nasal colonization of neonatal rats*. J Bacteriol, 2009. **191**(2): p. 571-5.
28. Camara, M., et al., *A neuraminidase from Streptococcus pneumoniae has the features of a surface protein*. Infect Immun, 1994. **62**(9): p. 3688-95.
29. Berry, A.M., R.A. Lock, and J.C. Paton, *Cloning and characterization of nanB, a second Streptococcus pneumoniae neuraminidase gene, and purification of the NanB enzyme from recombinant Escherichia coli*. J Bacteriol, 1996. **178**(16): p. 4854-60.
30. Estabrook, M.M., J.M. Griffiss, and G.A. Jarvis, *Sialylation of Neisseria meningitidis lipooligosaccharide inhibits serum bactericidal activity by masking lacto-N-neotetraose*. Infect Immun, 1997. **65**(11): p. 4436-44.
31. Hood, D.W., et al., *Sialic acid in the lipopolysaccharide of Haemophilus influenzae: strain distribution, influence on serum resistance and structural characterization*. Mol Microbiol, 1999. **33**(4): p. 679-92.
32. Shakhnovich, E.A., S.J. King, and J.N. Weiser, *Neuraminidase expressed by Streptococcus pneumoniae desialylates the lipopolysaccharide of Neisseria meningitidis and Haemophilus influenzae: a paradigm for interbacterial competition among pathogens of the human respiratory tract*. Infect Immun, 2002. **70**(12): p. 7161-4.
33. Lysenko, E.S., et al., *The role of innate immune responses in the outcome of interspecies competition for colonization of mucosal surfaces*. PLoS Pathog, 2005. **1**(1): p. e1.
34. Lysenko, E.S., et al., *Within-host competition drives selection for the capsule virulence determinant of Streptococcus pneumoniae*. Curr Biol, 2010. **20**(13): p. 1222-6.
35. Lux, T., et al., *Diversity of bacteriocins and activity spectrum in Streptococcus pneumoniae*. J Bacteriol, 2007. **189**(21): p. 7741-51.
36. Hechard, Y. and H.G. Sahl, *Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria*. Biochimie, 2002. **84**(5-6): p. 545-57.
37. Dawid, S., A.M. Roche, and J.N. Weiser, *The blp bacteriocins of Streptococcus pneumoniae mediate intraspecies competition both in vitro and in vivo*. Infect Immun, 2007. **75**(1): p. 443-51.
38. Dawid, S., M.E. Sebert, and J.N. Weiser, *Bacteriocin activity of Streptococcus pneumoniae is controlled by the serine protease HtrA via posttranscriptional regulation*. J Bacteriol, 2009. **191**(5): p. 1509-18.
39. Bakaletz, L.O., *Viral potentiation of bacterial superinfection of the respiratory tract*. Trends Microbiol, 1995. **3**(3): p. 110-4.

40. Morens, D.M., J.K. Taubenberger, and A.S. Fauci, *Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness*. J Infect Dis, 2008. **198**(7): p. 962-70.
41. Tong, H.H., et al., *Effect of adenovirus type 1 and influenza A virus on Streptococcus pneumoniae nasopharyngeal colonization and otitis media in the chinchilla*. Ann Otol Rhinol Laryngol, 2000. **109**(11): p. 1021-7.
42. Speshock, J.L., et al., *Filamentous influenza A virus infection predisposes mice to fatal septicemia following superinfection with Streptococcus pneumoniae serotype 3*. Infect Immun, 2007. **75**(6): p. 3102-11.
43. Avadhanula, V., et al., *Respiratory viruses augment the adhesion of bacterial pathogens to respiratory epithelium in a viral species- and cell type-dependent manner*. J Virol, 2006. **80**(4): p. 1629-36.
44. Smith, C.B., et al., *Interactions between viruses and bacteria in patients with chronic bronchitis*. J Infect Dis, 1976. **134**(6): p. 552-61.
45. Peltola, V.T. and J.A. McCullers, *Respiratory viruses predisposing to bacterial infections: role of neuraminidase*. Pediatr Infect Dis J, 2004. **23**(1 Suppl): p. S87-97.
46. Dubnau, D., *DNA uptake in bacteria*. Annu Rev Microbiol, 1999. **53**: p. 217-44.
47. Griffith, F., *The Significance of Pneumococcal Types*. J Hyg (Lond), 1928. **27**(2): p. 113-59.
48. Avery, O.T., C.M. Macleod, and M. McCarty, *Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type Iii*. J Exp Med, 1944. **79**(2): p. 137-58.
49. Havarstein, L.S., G. Coomaraswamy, and D.A. Morrison, *An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in Streptococcus pneumoniae*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(24): p. 11140-4.
50. Hui, F.M., L. Zhou, and D.A. Morrison, *Competence for genetic transformation in Streptococcus pneumoniae: organization of a regulatory locus with homology to two lactococcal A secretion genes*. Gene, 1995. **153**(1): p. 25-31.
51. Pestova, E.V., L.S. Havarstein, and D.A. Morrison, *Regulation of competence for genetic transformation in Streptococcus pneumoniae by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system*. Mol Microbiol, 1996. **21**(4): p. 853-62.
52. Martin, B., et al., *Cross-regulation of competence pheromone production and export in the early control of transformation in Streptococcus pneumoniae*. Mol Microbiol, 2000. **38**(4): p. 867-78.
53. Claverys, J.P. and L.S. Havarstein, *Extracellular-peptide control of competence for genetic transformation in Streptococcus pneumoniae*. Front Biosci, 2002. **7**: p. d1798-814.
54. Claverys, J.P., B. Grossiord, and G. Alloing, *Is the Ami-AliA/B oligopeptide permease of Streptococcus pneumoniae involved in sensing environmental conditions?* Res Microbiol, 2000. **151**(6): p. 457-63.
55. Ween, O., P. Gaustad, and L.S. Havarstein, *Identification of DNA binding sites for ComE, a key regulator of natural competence in Streptococcus pneumoniae*. Mol Microbiol, 1999. **33**(4): p. 817-27.
56. Lee, M.S. and D.A. Morrison, *Identification of a new regulator in Streptococcus pneumoniae linking quorum sensing to competence for genetic transformation*. J Bacteriol, 1999. **181**(16): p. 5004-16.

57. Luo, P. and D.A. Morrison, *Transient association of an alternative sigma factor, ComX, with RNA polymerase during the period of competence for genetic transformation in Streptococcus pneumoniae*. J Bacteriol, 2003. **185**(1): p. 349-58.
58. Laurenceau, R., et al., *A Type IV Pilus Mediates DNA Binding during Natural Transformation in Streptococcus pneumoniae*. PLoS Pathog, 2013. **9**(6): p. e1003473.
59. Berge, M., et al., *Uptake of transforming DNA in Gram-positive bacteria: a view from Streptococcus pneumoniae*. Mol Microbiol, 2002. **45**(2): p. 411-21.
60. Mejean, V. and J.P. Claverys, *Use of a cloned DNA fragment to analyze the fate of donor DNA in transformation of Streptococcus pneumoniae*. J Bacteriol, 1984. **158**(3): p. 1175-8.
61. Berge, M., et al., *Transformation of Streptococcus pneumoniae relies on DprA- and RecA-dependent protection of incoming DNA single strands*. Mol Microbiol, 2003. **50**(2): p. 527-36.
62. Mortier-Barriere, I., et al., *A key presynaptic role in transformation for a widespread bacterial protein: DprA conveys incoming ssDNA to RecA*. Cell, 2007. **130**(5): p. 824-36.
63. Quevillon-Cheruel, S., et al., *Structure-function analysis of pneumococcal DprA protein reveals that dimerization is crucial for loading RecA recombinase onto DNA during transformation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(37): p. E2466-75.
64. Coffey, T.J., et al., *Recombinational exchanges at the capsular polysaccharide biosynthetic locus lead to frequent serotype changes among natural isolates of Streptococcus pneumoniae*. Mol Microbiol, 1998. **27**(1): p. 73-83.
65. Jefferies, J.M., et al., *Genetic analysis of diverse disease-causing pneumococci indicates high levels of diversity within serotypes and capsule switching*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(12): p. 5681-8.
66. Dowson, C.G., et al., *Horizontal transfer of penicillin-binding protein genes in penicillin-resistant clinical isolates of Streptococcus pneumoniae*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(22): p. 8842-6.
67. Laible, G., B.G. Spratt, and R. Hakenbeck, *Interspecies recombinational events during the evolution of altered PBP 2x genes in penicillin-resistant clinical isolates of Streptococcus pneumoniae*. Mol Microbiol, 1991. **5**(8): p. 1993-2002.
68. Sibold, C., et al., *Mosaic pbpX genes of major clones of penicillin-resistant Streptococcus pneumoniae have evolved from pbpX genes of a penicillin-sensitive Streptococcus oralis*. Mol Microbiol, 1994. **12**(6): p. 1013-23.
69. Dagkessamanskaia, A., et al., *Interconnection of competence, stress and CiaR regulons in Streptococcus pneumoniae: competence triggers stationary phase autolysis of ciaR mutant cells*. Mol Microbiol, 2004. **51**(4): p. 1071-86.
70. Guiral, S., et al., *Competence-programmed predation of noncompetent cells in the human pathogen Streptococcus pneumoniae: genetic requirements*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(24): p. 8710-5.
71. Havarstein, L.S., et al., *New insights into the pneumococcal fratricide: relationship to clumping and identification of a novel immunity factor*. Mol Microbiol, 2006. **59**(4): p. 1297-307.
72. Eldholm, V., et al., *Fratricide in Streptococcus pneumoniae: contributions and role of the cell wall hydrolases CbpD, LytA and LytC*. Microbiology, 2009. **155**(Pt 7): p. 2223-34.
73. Moscoso, M. and J.P. Claverys, *Release of DNA into the medium by competent Streptococcus pneumoniae: kinetics, mechanism and stability of the liberated DNA*. Mol Microbiol, 2004. **54**(3): p. 783-94.

74. Ferretti, J.J., et al., *Complete genome sequence of an M1 strain of Streptococcus pyogenes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(8): p. 4658-63.
75. Tettelin, H., et al., *Complete genome sequence of a virulent isolate of Streptococcus pneumoniae*. Science, 2001. **293**(5529): p. 498-506.
76. Tettelin, H., et al., *Complete genome sequence of Neisseria meningitidis serogroup B strain MC58*. Science, 2000. **287**(5459): p. 1809-15.
77. Taniai, H., et al., *Concerted action of lactate oxidase and pyruvate oxidase in aerobic growth of Streptococcus pneumoniae: role of lactate as an energy source*. J Bacteriol, 2008. **190**(10): p. 3572-9.
78. Davis, K.M., et al., *Resistance to mucosal lysozyme compensates for the fitness deficit of peptidoglycan modifications by Streptococcus pneumoniae*. PLoS Pathog, 2008. **4**(12): p. e1000241.
79. Macleod, C.M. and M.R. Krauss, *Control by factors distinct from the S transforming principle of the amount of capsular polysaccharide produced by type III pneumococci*. J Exp Med, 1953. **97**(6): p. 767-71.
80. Yother, J., *Capsules*. In *The Pneumococcus*. Washington D.C. ASM Press, 2004: p. 30-48.
81. Bootsma, H.J., M. Egmont-Petersen, and P.W. Hermans, *Analysis of the in vitro transcriptional response of human pharyngeal epithelial cells to adherent Streptococcus pneumoniae: evidence for a distinct response to encapsulated strains*. Infect Immun, 2007. **75**(11): p. 5489-99.
82. Dalia, A.B. and J.N. Weiser, *Minimization of bacterial size allows for complement evasion and is overcome by the agglutinating effect of antibody*. Cell Host Microbe, 2011. **10**(5): p. 486-96.
83. Rodriguez, J.L., A.B. Dalia, and J.N. Weiser, *Increased chain length promotes pneumococcal adherence and colonization*. Infect Immun, 2012. **80**(10): p. 3454-9.
84. Hammerschmidt, S., et al., *Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells*. Infect Immun, 2005. **73**(8): p. 4653-67.
85. Nelson, A.L., et al., *Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance*. Infect Immun, 2007. **75**(1): p. 83-90.
86. Marks, L.R., G.I. Parameswaran, and A.P. Hakansson, *Pneumococcal interactions with epithelial cells are crucial for optimal biofilm formation and colonization in vitro and in vivo*. Infect Immun, 2012. **80**(8): p. 2744-60.
87. *Streptococcal Pneumoniae Meningitis*. Immunopaedia.org, 2010.
88. van Rossum, A.M., E.S. Lysenko, and J.N. Weiser, *Host and bacterial factors contributing to the clearance of colonization by Streptococcus pneumoniae in a murine model*. Infect Immun, 2005. **73**(11): p. 7718-26.
89. McCool, T.L. and J.N. Weiser, *Limited role of antibody in clearance of Streptococcus pneumoniae in a murine model of colonization*. Infect Immun, 2004. **72**(10): p. 5807-13.
90. Kolling, U.K., et al., *Leucocyte response and anti-inflammatory cytokines in community acquired pneumonia*. Thorax, 2001. **56**(2): p. 121-5.
91. Underhill, D.M. and A. Ozinsky, *Phagocytosis of microbes: complexity in action*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 825-52.
92. Kirby, A.C., J.G. Raynes, and P.M. Kaye, *The role played by tumor necrosis factor during localized and systemic infection with Streptococcus pneumoniae*. J Infect Dis, 2005. **191**(9): p. 1538-47.
93. Brinkmann, V., et al., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1532-5.

94. Beiter, K., et al., *An endonuclease allows Streptococcus pneumoniae to escape from neutrophil extracellular traps*. *Curr Biol*, 2006. **16**(4): p. 401-7.
95. Janeway, C.J., *Immunobiology*. NYC Current Biology Publication Garland Publishing, 2005(6th edition).
96. Kang, Y.S., et al., *The C-type lectin SIGN-R1 mediates uptake of the capsular polysaccharide of Streptococcus pneumoniae in the marginal zone of mouse spleen*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(1): p. 215-20.
97. Lanoue, A., et al., *SIGN-R1 contributes to protection against lethal pneumococcal infection in mice*. *J Exp Med*, 2004. **200**(11): p. 1383-93.
98. Koppel, E.A., et al., *Specific ICAM-3 grabbing nonintegrin-related 1 (SIGNR1) expressed by marginal zone macrophages is essential for defense against pulmonary Streptococcus pneumoniae infection*. *Eur J Immunol*, 2005. **35**(10): p. 2962-9.
99. Arredouani, M., et al., *The scavenger receptor MARCO is required for lung defense against pneumococcal pneumonia and inhaled particles*. *J Exp Med*, 2004. **200**(2): p. 267-72.
100. Arredouani, M.S., et al., *The macrophage scavenger receptor SR-AI/II and lung defense against pneumococci and particles*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2006. **35**(4): p. 474-8.
101. Yoshimura, A., et al., *Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2*. *J Immunol*, 1999. **163**(1): p. 1-5.
102. Weber, J.R., et al., *Recognition of pneumococcal peptidoglycan: an expanded, pivotal role for LPS binding protein*. *Immunity*, 2003. **19**(2): p. 269-79.
103. Han, S.H., et al., *Pneumococcal lipoteichoic acid (LTA) is not as potent as staphylococcal LTA in stimulating Toll-like receptor 2*. *Infect Immun*, 2003. **71**(10): p. 5541-8.
104. Schroder, N.W., et al., *Lipoteichoic acid (LTA) of Streptococcus pneumoniae and Staphylococcus aureus activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(18): p. 15587-94.
105. Echchannaoui, H., et al., *Toll-like receptor 2-deficient mice are highly susceptible to Streptococcus pneumoniae meningitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation*. *J Infect Dis*, 2002. **186**(6): p. 798-806.
106. Koedel, U., et al., *Toll-like receptor 2 participates in mediation of immune response in experimental pneumococcal meningitis*. *J Immunol*, 2003. **170**(1): p. 438-44.
107. Knapp, S., et al., *Toll-like receptor 2 plays a role in the early inflammatory response to murine pneumococcal pneumonia but does not contribute to antibacterial defense*. *J Immunol*, 2004. **172**(5): p. 3132-8.
108. Ozinsky, A., et al., *The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(25): p. 13766-71.
109. Branger, J., et al., *LPS-binding protein-deficient mice have an impaired defense against Gram-negative but not Gram-positive pneumonia*. *Int Immunol*, 2004. **16**(11): p. 1605-11.
110. Srivastava, A., et al., *The apoptotic response to pneumolysin is Toll-like receptor 4 dependent and protects against pneumococcal disease*. *Infect Immun*, 2005. **73**(10): p. 6479-87.
111. Malley, R., et al., *CD4+ T cells mediate antibody-independent acquired immunity to pneumococcal colonization*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(13): p. 4848-53.

112. Branger, J., et al., *Role of Toll-like receptor 4 in gram-positive and gram-negative pneumonia in mice*. Infect Immun, 2004. **72**(2): p. 788-94.
113. Benton, K.A., J.C. Paton, and D.E. Briles, *The hemolytic and complement-activating properties of pneumolysin do not contribute individually to virulence in a pneumococcal bacteremia model*. Microb Pathog, 1997. **23**(4): p. 201-9.
114. Ishii, K.J. and S. Akira, *Innate immune recognition of, and regulation by, DNA*. Trends Immunol, 2006. **27**(11): p. 525-32.
115. Krieg, A.M., *The role of CpG motifs in innate immunity*. Curr Opin Immunol, 2000. **12**(1): p. 35-43.
116. Khan, A.Q., et al., *Both innate immunity and type I humoral immunity to Streptococcus pneumoniae are mediated by MyD88 but differ in their relative levels of dependence on toll-like receptor 2*. Infect Immun, 2005. **73**(1): p. 298-307.
117. Koedel, U., et al., *MyD88 is required for mounting a robust host immune response to Streptococcus pneumoniae in the CNS*. Brain, 2004. **127**(Pt 6): p. 1437-45.
118. Albiger, B., et al., *Myeloid differentiation factor 88-dependent signalling controls bacterial growth during colonization and systemic pneumococcal disease in mice*. Cell Microbiol, 2005. **7**(11): p. 1603-15.
119. Davis, K.M., S. Nakamura, and J.N. Weiser, *Nod2 sensing of lysozyme-digested peptidoglycan promotes macrophage recruitment and clearance of S. pneumoniae colonization in mice*. J Clin Invest, 2011. **121**(9): p. 3666-76.
120. Opitz, B., et al., *Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized Streptococcus pneumoniae*. J Biol Chem, 2004. **279**(35): p. 36426-32.
121. Liu, X., et al., *NOD2 mediates inflammatory responses of primary murine glia to Streptococcus pneumoniae*. Glia, 2010. **58**(7): p. 839-47.
122. Lysenko, E.S., et al., *Nod1 signaling overcomes resistance of S. pneumoniae to opsonophagocytic killing*. PLoS Pathog, 2007. **3**(8): p. e118.
123. Joyce, E.A., S.J. Popper, and S. Falkow, *Streptococcus pneumoniae nasopharyngeal colonization induces type I interferons and interferon-induced gene expression*. BMC Genomics, 2009. **10**: p. 404.
124. Nakamura, S., K.M. Davis, and J.N. Weiser, *Synergistic stimulation of type I interferons during influenza virus coinfection promotes Streptococcus pneumoniae colonization in mice*. J Clin Invest, 2011. **121**(9): p. 3657-65.
125. Koppe, U., et al., *Streptococcus pneumoniae stimulates a STING- and IFN regulatory factor 3-dependent type I IFN production in macrophages, which regulates RANTES production in macrophages, cocultured alveolar epithelial cells, and mouse lungs*. J Immunol, 2012. **188**(2): p. 811-7.
126. Shahangian, A., et al., *Type I IFNs mediate development of postinfluenza bacterial pneumonia in mice*. J Clin Invest, 2009. **119**(7): p. 1910-20.
127. Pepys, M.B. and G.M. Hirschfield, *C-reactive protein: a critical update*. J Clin Invest, 2003. **111**(12): p. 1805-12.
128. Szalai, A.J., et al., *C-reactive protein: structural biology, gene expression, and host defense function*. Immunol Res, 1997. **16**(2): p. 127-36.
129. Christner, R.B. and R.F. Mortensen, *Binding of human serum amyloid P-component to phosphocholine*. Arch Biochem Biophys, 1994. **314**(2): p. 337-43.
130. Bharadwaj, D., et al., *The major receptor for C-reactive protein on leukocytes is fcgamma receptor II*. J Exp Med, 1999. **190**(4): p. 585-90.
131. Mold, C., H.D. Gresham, and T.W. Du Clos, *Serum amyloid P component and C-reactive protein mediate phagocytosis through murine Fc gamma Rs*. J Immunol, 2001. **166**(2): p. 1200-5.

132. Inforzato, A., et al., *Structural characterization of PTX3 disulfide bond network and its multimeric status in cumulus matrix organization*. J Biol Chem, 2008. **283**(15): p. 10147-61.
133. Breviario, F., et al., *Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component*. J Biol Chem, 1992. **267**(31): p. 22190-7.
134. Garlanda, C., et al., *Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response*. Nature, 2002. **420**(6912): p. 182-6.
135. Jeannin, P., et al., *Complexity and complementarity of outer membrane protein A recognition by cellular and humoral innate immunity receptors*. Immunity, 2005. **22**(5): p. 551-60.
136. Jounblat, R., et al., *The role of surfactant protein D in the colonisation of the respiratory tract and onset of bacteraemia during pneumococcal pneumonia*. Respir Res, 2005. **6**: p. 126.
137. Kuronuma, K., et al., *Pulmonary surfactant protein A augments the phagocytosis of Streptococcus pneumoniae by alveolar macrophages through a casein kinase 2-dependent increase of cell surface localization of scavenger receptor A*. J Biol Chem, 2004. **279**(20): p. 21421-30.
138. Nepomuceno, R.R., et al., *cDNA cloning and primary structure analysis of CIqR(P), the human CIq/MBL/SPA receptor that mediates enhanced phagocytosis in vitro*. Immunity, 1997. **6**(2): p. 119-29.
139. Chronos, Z.C., et al., *Purification of a cell-surface receptor for surfactant protein A*. J Biol Chem, 1996. **271**(27): p. 16375-83.
140. Gardai, S.J., et al., *By binding SIRPalpha or calreticulin/CD91, lung collectins act as dual function surveillance molecules to suppress or enhance inflammation*. Cell, 2003. **115**(1): p. 13-23.
141. Holmskov, U., et al., *Cloning of gp-340, a putative opsonin receptor for lung surfactant protein D*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(19): p. 10794-9.
142. Brown, J.S., et al., *The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to Streptococcus pneumoniae infection in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(26): p. 16969-74.
143. Ali, Y.M., et al., *The lectin pathway of complement activation is a critical component of the innate immune response to pneumococcal infection*. PLoS Pathog, 2012. **8**(7): p. e1002793.
144. Kjaer, T.R., et al., *M-ficolin binds selectively to the capsular polysaccharides of Streptococcus pneumoniae serotypes 19B and 19C and of a Streptococcus mitis strain*. Infect Immun, 2013. **81**(2): p. 452-9.
145. Forneris, F., J. Wu, and P. Gros, *The modular serine proteases of the complement cascade*. Curr Opin Struct Biol, 2012. **22**(3): p. 333-41.
146. Joiner, K., et al., *Studies on the mechanism of bacterial resistance to complement-mediated killing. III. C5b-9 deposits stably on rough and type 7 S. pneumoniae without causing bacterial killing*. J Immunol, 1983. **130**(2): p. 845-9.
147. Davis, A.E., 3rd, P. Mejia, and F. Lu, *Biological activities of C1 inhibitor*. Mol Immunol, 2008. **45**(16): p. 4057-63.
148. Blom, A.M., B.O. Villoutreix, and B. Dahlback, *Complement inhibitor C4b-binding protein-friend or foe in the innate immune system?* Mol Immunol, 2004. **40**(18): p. 1333-46.
149. Jozsi, M. and P.F. Zipfel, *Factor H family proteins and human diseases*. Trends Immunol, 2008. **29**(8): p. 380-7.

150. Schwarz, M., et al., *Potential protective role of apoprotein J (clusterin) in atherogenesis: binding to enzymatically modified low-density lipoprotein reduces fatty acid-mediated cytotoxicity*. *Thromb Haemost*, 2008. **100**(1): p. 110-8.
151. Heinen, S., et al., *Factor H-related protein 1 (CFHR-1) inhibits complement C5 convertase activity and terminal complex formation*. *Blood*, 2009. **114**(12): p. 2439-47.
152. Preissner, K.T. and D. Seiffert, *Role of vitronectin and its receptors in haemostasis and vascular remodeling*. *Thromb Res*, 1998. **89**(1): p. 1-21.
153. Seya, T. and J.P. Atkinson, *Functional properties of membrane cofactor protein of complement*. *Biochem J*, 1989. **264**(2): p. 581-8.
154. Spendlove, I., et al., *Complement decay accelerating factor (DAF)/CD55 in cancer*. *Cancer Immunol Immunother*, 2006. **55**(8): p. 987-95.
155. Kimberley, F.C., B. Sivasankar, and B. Paul Morgan, *Alternative roles for CD59*. *Mol Immunol*, 2007. **44**(1-3): p. 73-81.
156. Kishore, U. and K.B. Reid, *C1q: structure, function, and receptors*. *Immunopharmacology*, 2000. **49**(1-2): p. 159-70.
157. Arlaud, G.J., et al., *Structural biology of C1*. *Biochem Soc Trans*, 2002. **30**(Pt 6): p. 1001-6.
158. Cooper, N.R., *The classical complement pathway: activation and regulation of the first complement component*. *Adv Immunol*, 1985. **37**: p. 151-216.
159. Paidassi, H., et al., *C1q binds phosphatidylserine and likely acts as a multiligand-bridging molecule in apoptotic cell recognition*. *J Immunol*, 2008. **180**(4): p. 2329-38.
160. Paidassi, H., et al., *The lectin-like activity of human C1q and its implication in DNA and apoptotic cell recognition*. *FEBS Lett*, 2008. **582**(20): p. 3111-6.
161. Gaboriaud, C., et al., *The crystal structure of the globular head of complement protein C1q provides a basis for its versatile recognition properties*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(47): p. 46974-82.
162. Gaboriaud, C., et al., *Structure and activation of the C1 complex of complement: unraveling the puzzle*. *Trends Immunol*, 2004. **25**(7): p. 368-73.
163. Szalai, A.J., et al., *C-reactive protein: structural biology and host defense function*. *Clin Chem Lab Med*, 1999. **37**(3): p. 265-70.
164. Ying, S.C., et al., *Human serum amyloid P component oligomers bind and activate the classical complement pathway via residues 14-26 and 76-92 of the A chain collagen-like region of C1q*. *J Immunol*, 1993. **150**(1): p. 169-76.
165. Nauta, A.J., et al., *Biochemical and functional characterization of the interaction between pentraxin 3 and C1q*. *Eur J Immunol*, 2003. **33**(2): p. 465-73.
166. Duncan, A.R. and G. Winter, *The binding site for C1q on IgG*. *Nature*, 1988. **332**(6166): p. 738-40.
167. MacKenzie, M.R., N. Creevy, and M. Heh, *The interaction of human IgM and C1q*. *J Immunol*, 1971. **106**(1): p. 65-8.
168. Agrawal, A., et al., *Topology and structure of the C1q-binding site on C-reactive protein*. *J Immunol*, 2001. **166**(6): p. 3998-4004.
169. Shrive, A.K., et al., *Three dimensional structure of human C-reactive protein*. *Nat Struct Biol*, 1996. **3**(4): p. 346-54.
170. Saphire, E.O., et al., *Crystal structure of a neutralizing human IGG against HIV-1: a template for vaccine design*. *Science*, 2001. **293**(5532): p. 1155-9.
171. Idusogie, E.E., et al., *Mapping of the C1q binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc*. *J Immunol*, 2000. **164**(8): p. 4178-84.
172. Idusogie, E.E., et al., *Engineered antibodies with increased activity to recruit complement*. *J Immunol*, 2001. **166**(4): p. 2571-5.

173. Hezareh, M., et al., *Effector function activities of a panel of mutants of a broadly neutralizing antibody against human immunodeficiency virus type 1*. J Virol, 2001. **75**(24): p. 12161-8.
174. Marques, G., et al., *Arginine residues of the globular regions of human C1q involved in the interaction with immunoglobulin G*. J Biol Chem, 1993. **268**(14): p. 10393-402.
175. Reid, K.B., *Activation and control of the complement system*. Essays Biochem, 1986. **22**: p. 27-68.
176. Gregory, L.A., et al., *X-ray structure of the Ca²⁺-binding interaction domain of C1s. Insights into the assembly of the C1 complex of complement*. J Biol Chem, 2003. **278**(34): p. 32157-64.
177. Budayova-Spano, M., et al., *The crystal structure of the zymogen catalytic domain of complement protease C1r reveals that a disruptive mechanical stress is required to trigger activation of the C1 complex*. EMBO J, 2002. **21**(3): p. 231-9.
178. Lacroix, M., et al., *Assembly and enzymatic properties of the catalytic domain of human complement protease C1r*. J Biol Chem, 2001. **276**(39): p. 36233-40.
179. Poon, P.H., et al., *Conformation and restricted segmental flexibility of C1, the first component of human complement*. J Mol Biol, 1983. **168**(3): p. 563-77.
180. Gaboriaud, C., et al., *Crystal structure of the catalytic domain of human complement c1s: a serine protease with a handle*. EMBO J, 2000. **19**(8): p. 1755-65.
181. Ogden, C.A., et al., *C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells*. J Exp Med, 2001. **194**(6): p. 781-95.
182. Klickstein, L.B., et al., *Complement receptor type 1 (CR1, CD35) is a receptor for C1q*. Immunity, 1997. **7**(3): p. 345-55.
183. Shin, H.S., M.R. Smith, and W.B. Wood, Jr., *Heat labile opsonins to pneumococcus. II. Involvement of C3 and C5*. J Exp Med, 1969. **130**(6): p. 1229-41.
184. Sengelov, H., et al., *Secretory vesicles are the intracellular reservoir of complement receptor 1 in human neutrophils*. J Immunol, 1994. **153**(2): p. 804-10.
185. Weis, J.J., T.F. Tedder, and D.T. Fearon, *Identification of a 145,000 Mr membrane protein as the C3d receptor (CR2) of human B lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(3): p. 881-5.
186. Zhang, L. and E.F. Plow, *Overlapping, but not identical, sites are involved in the recognition of C3bi, neutrophil inhibitory factor, and adhesive ligands by the alphaMbeta2 integrin*. J Biol Chem, 1996. **271**(30): p. 18211-6.
187. Ross, G.D., *Regulation of the adhesion versus cytotoxic functions of the Mac-1/CR3/alphaMbeta2-integrin glycoprotein*. Crit Rev Immunol, 2000. **20**(3): p. 197-222.
188. Wiesmann, C., et al., *Structure of C3b in complex with CRIg gives insights into regulation of complement activation*. Nature, 2006. **444**(7116): p. 217-20.
189. Hugli, T.E., *Biochemistry and biology of anaphylatoxins*. Complement, 1986. **3**(3): p. 111-27.
190. Gennaro, R., et al., *C5a fragment of bovine complement. Purification, bioassays, amino-acid sequence and other structural studies*. Eur J Biochem, 1986. **155**(1): p. 77-86.
191. Damerau, B., H.G. Hollerhage, and W. Vogt, *Effects of the cleavage peptides, C3q and C3ai, from the third component of hog complement on leukocyte accumulation and vascular permeability in vivo*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1978. **302**(1): p. 45-50.
192. Hartmann, K., et al., *C3a and C5a stimulate chemotaxis of human mast cells*. Blood, 1997. **89**(8): p. 2863-70.

193. Peng, Q., et al., *Local production and activation of complement up-regulates the allostimulatory function of dendritic cells through C3a-C3aR interaction*. *Blood*, 2008. **111**(4): p. 2452-61.
194. Zhang, Z., T.B. Clarke, and J.N. Weiser, *Cellular effectors mediating Th17-dependent clearance of pneumococcal colonization in mice*. *J Clin Invest*, 2009. **119**(7): p. 1899-909.
195. Toews, G.B. and W.C. Vial, *The role of C5 in polymorphonuclear leukocyte recruitment in response to Streptococcus pneumoniae*. *Am Rev Respir Dis*, 1984. **129**(1): p. 82-6.
196. Weaver, D.J., Jr., et al., *C5a receptor-deficient dendritic cells promote induction of Treg and Th17 cells*. *Eur J Immunol*, 2010. **40**(3): p. 710-21.
197. Stockinger, B. and M. Veldhoen, *Differentiation and function of Th17 T cells*. *Curr Opin Immunol*, 2007. **19**(3): p. 281-6.
198. Miossec, P., T. Korn, and V.K. Kuchroo, *Interleukin-17 and type 17 helper T cells*. *N Engl J Med*, 2009. **361**(9): p. 888-98.
199. Kindt, T.J., et al., *Kuby Immunology*. W.H. Freeman, 2007.
200. Black, S., et al., *Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children*. *Northern California Kaiser Permanente Vaccine Study Center Group*. *Pediatr Infect Dis J*, 2000. **19**(3): p. 187-95.
201. Briles, D.E., et al., *Immunizations with pneumococcal surface protein A and pneumolysin are protective against pneumonia in a murine model of pulmonary infection with Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis*, 2003. **188**(3): p. 339-48.
202. Kolble, K. and K.B. Reid, *Genetic deficiencies of the complement system and association with disease--early components*. *Int Rev Immunol*, 1993. **10**(1): p. 17-36.
203. Botto, M., et al., *Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies*. *Nat Genet*, 1998. **19**(1): p. 56-9.
204. Mevorach, D., et al., *Systemic exposure to irradiated apoptotic cells induces autoantibody production*. *J Exp Med*, 1998. **188**(2): p. 387-92.
205. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. *Br J Cancer*, 1972. **26**(4): p. 239-57.
206. Sanders, E.J. and M.A. Wride, *Programmed cell death in development*. *Int Rev Cytol*, 1995. **163**: p. 105-73.
207. Naruse, I. and H. Keino, *Apoptosis in the developing CNS*. *Prog Neurobiol*, 1995. **47**(2): p. 135-55.
208. Fesus, L., *Apoptosis fashions T and B cell repertoire*. *Immunol Lett*, 1991. **30**(3): p. 277-82.
209. Osborne, B.A., *Apoptosis and the maintenance of homeostasis in the immune system*. *Curr Opin Immunol*, 1996. **8**(2): p. 245-54.
210. Murnane, J.P., *Cell cycle regulation in response to DNA damage in mammalian cells: a historical perspective*. *Cancer Metastasis Rev*, 1995. **14**(1): p. 17-29.
211. Thompson, C.B., *Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease*. *Science*, 1995. **267**(5203): p. 1456-62.
212. Evan, G. and T. Littlewood, *A matter of life and cell death*. *Science*, 1998. **281**(5381): p. 1317-22.
213. Flannagan, R.S., V. Jaumouille, and S. Grinstein, *The cell biology of phagocytosis*. *Annu Rev Pathol*, 2012. **7**: p. 61-98.
214. Cregan, S.P., V.L. Dawson, and R.S. Slack, *Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death*. *Oncogene*, 2004. **23**(16): p. 2785-96.
215. Breckenridge, D.G., et al., *Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways*. *Oncogene*, 2003. **22**(53): p. 8608-18.

216. Korb, L.C. and J.M. Ahearn, *C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited*. J Immunol, 1997. **158**(10): p. 4525-8.
217. Navratil, J.S., et al., *The globular heads of C1q specifically recognize surface blebs of apoptotic vascular endothelial cells*. J Immunol, 2001. **166**(5): p. 3231-9.
218. Mevorach, D., et al., *Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages*. J Exp Med, 1998. **188**(12): p. 2313-20.
219. Gullstrand, B., et al., *Complement classical pathway components are all important in clearance of apoptotic and secondary necrotic cells*. Clin Exp Immunol, 2009. **156**(2): p. 303-11.
220. Nauta, A.J., et al., *Direct binding of C1q to apoptotic cells and cell blebs induces complement activation*. Eur J Immunol, 2002. **32**(6): p. 1726-36.
221. Zwart, B., et al., *Complement activation by apoptotic cells occurs predominantly via IgM and is limited to late apoptotic (secondary necrotic) cells*. Autoimmunity, 2004. **37**(2): p. 95-102.
222. Ogden, C.A., et al., *IGM is required for efficient complement mediated phagocytosis of apoptotic cells in vivo*. Autoimmunity, 2005. **38**(4): p. 259-64.
223. Takizawa, F., S. Tsuji, and S. Nagasawa, *Enhancement of macrophage phagocytosis upon iC3b deposition on apoptotic cells*. FEBS Lett, 1996. **397**(2-3): p. 269-72.
224. Kim, S.J., et al., *Opsonization of apoptotic cells and its effect on macrophage and T cell immune responses*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **987**: p. 68-78.
225. Amarilyo, G., et al., *iC3b-opsonized apoptotic cells mediate a distinct anti-inflammatory response and transcriptional NF-kappaB-dependent blockade*. Eur J Immunol, 2010. **40**(3): p. 699-709.
226. Pasteur, L., *Sur une maladie nouvelle provoquée par la salive d'un enfant mort de rage*. Acad. D. Sc. De Paris, 1881. **92**(159).
227. Dochez, A.R. and O.T. Avery, *Varieties of Pneumococcus and Their Relation to Lobar Pneumonia*. J Exp Med, 1915. **21**(2): p. 114-32.
228. Avery, O.T. and H.J. Morgan, *Immunological Reactions of the Isolated Carbohydrate and Protein of Pneumococcus*. J Exp Med, 1925. **42**(3): p. 347-53.
229. Kamerling, J.P., *Pneumococcal polysaccharides: A chemical view*. In *Streptococcus pneumoniae: Molecular Biology & Mechanisms of disease*. NYC A. Tomasz, ed, 2000: p. 81-114.
230. Sorensen, U.B., et al., *Covalent linkage between the capsular polysaccharide and the cell wall peptidoglycan of Streptococcus pneumoniae revealed by immunochemical methods*. Microb Pathog, 1990. **8**(5): p. 325-34.
231. Lynch, J.P., 3rd and G.G. Zhanel, *Streptococcus pneumoniae: epidemiology and risk factors, evolution of antimicrobial resistance, and impact of vaccines*. Curr Opin Pulm Med, 2010. **16**(3): p. 217-25.
232. Brisou, P., T. Gaillard, and Y. Muzellec, *Infections à pneumocoque*. Encyclopédie Médico-chirurgicale. (France), 2004.
233. Morona, J.K., et al., *Tyrosine phosphorylation of CpsD negatively regulates capsular polysaccharide biosynthesis in streptococcus pneumoniae*. Mol Microbiol, 2000. **35**(6): p. 1431-42.
234. Morona, J.K., et al., *Streptococcus pneumoniae capsule biosynthesis protein CpsB is a novel manganese-dependent phosphotyrosine-protein phosphatase*. J Bacteriol, 2002. **184**(2): p. 577-83.
235. Morona, J.K., et al., *Mutational analysis of the carboxy-terminal (YGX)₄ repeat domain of CpsD, an autophosphorylating tyrosine kinase required for capsule biosynthesis in Streptococcus pneumoniae*. J Bacteriol, 2003. **185**(10): p. 3009-19.

236. Bender, M.H., R.T. Cartee, and J. Yother, *Positive correlation between tyrosine phosphorylation of CpsD and capsular polysaccharide production in Streptococcus pneumoniae*. J Bacteriol, 2003. **185**(20): p. 6057-66.
237. Mohammadi, T., et al., *Identification of FtsW as a transporter of lipid-linked cell wall precursors across the membrane*. EMBO J, 2011. **30**(8): p. 1425-32.
238. Tipper, D.J. and J.L. Strominger, *Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1965. **54**(4): p. 1133-41.
239. Strominger, J.L. and D.J. Tipper, *Bacterial cell wall synthesis and structure in relation to the mechanism of action of penicillins and other antibacterial agents*. Am J Med, 1965. **39**(5): p. 708-21.
240. Blumberg, P.M. and J.L. Strominger, *Five penicillin-binding components occur in Bacillus subtilis membranes*. J Biol Chem, 1972. **247**(24): p. 8107-13.
241. den Blaauwen, T., et al., *Morphogenesis of rod-shaped sacculi*. FEMS Microbiol Rev, 2008. **32**(2): p. 321-44.
242. Tillett, W.S., W.F. Goebel, and O.T. Avery, *Chemical and Immunological Properties of a Species-Specific Carbohydrate of Pneumococci*. J Exp Med, 1930. **52**(6): p. 895-900.
243. Goebel, W.F. and M.H. Adams, *The Immunological Properties of the Heterophile Antigen and Somatic Polysaccharide of Pneumococcus*. J Exp Med, 1943. **77**(5): p. 435-49.
244. Tillett, W.S. and T. Francis, *Serological Reactions in Pneumonia with a Non-Protein Somatic Fraction of Pneumococcus*. J Exp Med, 1930. **52**(4): p. 561-71.
245. Seo, H.S., et al., *A new model of pneumococcal lipoteichoic acid structure resolves biochemical, biosynthetic, and serologic inconsistencies of the current model*. J Bacteriol, 2008. **190**(7): p. 2379-87.
246. Fisher, W., *Pneumococcal Lipoteichoic and Teichoic Acid*. In *Streptococcus pneumoniae: Molecular Biology & Mechanisms of Disease*. NYC A. Tomasz, ed, 2000: p. 155-177.
247. Tomasz, A., *Choline in the cell wall of a bacterium: novel type of polymer-linked choline in Pneumococcus*. Science, 1967. **157**(3789): p. 694-7.
248. Briles, E.B. and A. Tomasz, *Pneumococcal Forssman antigen. A choline-containing lipoteichoic acid*. J Biol Chem, 1973. **248**(18): p. 6394-7.
249. Tomasz, A. and W. Fischer, *The cell wall of Streptococcus pneumoniae*. In *Gram-Positive Pathogens*. V.A.F.e. al. ed., 2000: p. 191-200.
250. Hoskins, J., et al., *Genome of the bacterium Streptococcus pneumoniae strain R6*. J Bacteriol, 2001. **183**(19): p. 5709-17.
251. Sjoquist, J., et al., *Localization of protein A in the bacteria*. Eur J Biochem, 1972. **30**(1): p. 190-4.
252. Pancholi, V. and V.A. Fischetti, *Isolation and characterization of the cell-associated region of group A streptococcal M6 protein*. J Bacteriol, 1988. **170**(6): p. 2618-24.
253. Pancholi, V. and V.A. Fischetti, *Identification of an endogenous membrane anchor-cleaving enzyme for group A streptococcal M protein. Its implication for the attachment of surface proteins in gram-positive bacteria*. J Exp Med, 1989. **170**(6): p. 2119-33.
254. Schneewind, O., P. Model, and V.A. Fischetti, *Sorting of protein A to the staphylococcal cell wall*. Cell, 1992. **70**(2): p. 267-81.
255. Schneewind, O., A. Fowler, and K.F. Faull, *Structure of the cell wall anchor of surface proteins in Staphylococcus aureus*. Science, 1995. **268**(5207): p. 103-6.

256. Schneewind, O., D. Mihaylova-Petkov, and P. Model, *Cell wall sorting signals in surface proteins of gram-positive bacteria*. EMBO J, 1993. **12**(12): p. 4803-11.
257. Mazmanian, S.K., et al., *Staphylococcus aureus sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall*. Science, 1999. **285**(5428): p. 760-3.
258. Ilangovan, U., et al., *Structure of sortase, the transpeptidase that anchors proteins to the cell wall of Staphylococcus aureus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(11): p. 6056-61.
259. Pallen, M.J., et al., *An embarrassment of sortases - a richness of substrates?* Trends Microbiol, 2001. **9**(3): p. 97-102.
260. Perry, A.M., et al., *Anchoring of surface proteins to the cell wall of Staphylococcus aureus. III. Lipid II is an in vivo peptidoglycan substrate for sortase-catalyzed surface protein anchoring*. J Biol Chem, 2002. **277**(18): p. 16241-8.
261. Ton-That, H., et al., *Anchoring of surface proteins to the cell wall of Staphylococcus aureus. Cysteine 184 and histidine 120 of sortase form a thiolate-imidazolium ion pair for catalysis*. J Biol Chem, 2002. **277**(9): p. 7447-52.
262. Ruzin, A., et al., *Further evidence that a cell wall precursor [C(55)-MurNAc-(peptide)-GlcNAc] serves as an acceptor in a sorting reaction*. J Bacteriol, 2002. **184**(8): p. 2141-7.
263. Ton-That, H. and O. Schneewind, *Assembly of pili in Gram-positive bacteria*. Trends Microbiol, 2004. **12**(5): p. 228-34.
264. Manzano, C., et al., *Sortase-mediated pilus fiber biogenesis in Streptococcus pneumoniae*. Structure, 2008. **16**(12): p. 1838-48.
265. El Mortaji, L., et al., *Stability and assembly of pilus subunits of Streptococcus pneumoniae*. J Biol Chem, 2010. **285**(16): p. 12405-15.
266. El Mortaji, L., et al., *The full-length Streptococcus pneumoniae major pilin RrgB crystallizes in a fibre-like structure, which presents the D1 isopeptide bond and provides details on the mechanism of pilus polymerization*. Biochem J, 2012. **441**(3): p. 833-41.
267. El Mortaji, L., et al., *Association of RrgA and RrgC into the Streptococcus pneumoniae pilus by sortases C-2 and C-3*. Biochemistry, 2012. **51**(1): p. 342-52.
268. Bean, B. and A. Tomasz, *Choline metabolism in pneumococci*. J Bacteriol, 1977. **130**(1): p. 571-4.
269. Behr, T., et al., *The structure of pneumococcal lipoteichoic acid. Improved preparation, chemical and mass spectrometric studies*. Eur J Biochem, 1992. **207**(3): p. 1063-75.
270. Lopez, R. and E. Garcia, *Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage*. FEMS Microbiol Rev, 2004. **28**(5): p. 553-80.
271. Lopez, R., et al., *Choline-containing bacteriophage receptors in Streptococcus pneumoniae*. J Bacteriol, 1982. **151**(3): p. 1581-90.
272. Tuomanen, E., *The Pneumococcus*. ASM Press, 2004.
273. Fernandez-Tornero, C., et al., *A novel solenoid fold in the cell wall anchoring domain of the pneumococcal virulence factor LytA*. Nat Struct Biol, 2001. **8**(12): p. 1020-4.
274. Garcia, E., et al., *Molecular evolution of lytic enzymes of Streptococcus pneumoniae and its bacteriophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(3): p. 914-8.
275. Garcia, J.L., et al., *Versatility of choline-binding domain*. Microb Drug Resist, 1998. **4**(1): p. 25-36.
276. Frolet, C., et al., *New adhesin functions of surface-exposed pneumococcal proteins*. BMC Microbiol, 2010. **10**: p. 190.

277. Oudega, B., et al., *A lipoprotein signal peptide plus a cysteine residue at the amino-terminal end of the periplasmic protein beta-lactamase is sufficient for its lipid modification, processing and membrane localization in Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett, 1993. **108**(3): p. 353-9.
278. Jedrzejas, M.J., *Unveiling molecular mechanisms of bacterial surface proteins: Streptococcus pneumoniae as a model organism for structural studies*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(21): p. 2799-822.
279. Khandavilli, S., et al., *Maturation of Streptococcus pneumoniae lipoproteins by a type II signal peptidase is required for ABC transporter function and full virulence*. Mol Microbiol, 2008. **67**(3): p. 541-57.
280. Babu, M.M., et al., *A database of bacterial lipoproteins (DOLOP) with functional assignments to predicted lipoproteins*. J Bacteriol, 2006. **188**(8): p. 2761-73.
281. Chen, C.C., et al., *Human erythrocyte glucose transporter: normal asymmetric orientation and function in liposomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(8): p. 2652-6.
282. Gros, P., J. Croop, and D. Housman, *Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins*. Cell, 1986. **47**(3): p. 371-80.
283. Cui, J. and A.L. Davidson, *ABC solute importers in bacteria*. Essays Biochem, 2011. **50**(1): p. 85-99.
284. Bergmann, S. and S. Hammerschmidt, *Versatility of pneumococcal surface proteins*. Microbiology, 2006. **152**(Pt 2): p. 295-303.
285. Medzhitov, R., *Recognition of microorganisms and activation of the immune response*. Nature, 2007. **449**(7164): p. 819-26.
286. Lee, C.J., S.D. Banks, and J.P. Li, *Virulence, immunity, and vaccine related to Streptococcus pneumoniae*. Crit Rev Microbiol, 1991. **18**(2): p. 89-114.
287. Hyams, C., et al., *The Streptococcus pneumoniae capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms*. Infect Immun, 2010. **78**(2): p. 704-15.
288. Hyams, C., et al., *Streptococcus pneumoniae resistance to complement-mediated immunity is dependent on the capsular serotype*. Infect Immun, 2010. **78**(2): p. 716-25.
289. Kim, J.O., et al., *Relationship between cell surface carbohydrates and intrastain variation on opsonophagocytosis of Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun, 1999. **67**(5): p. 2327-33.
290. Magee, A.D. and J. Yother, *Requirement for capsule in colonization by Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun, 2001. **69**(6): p. 3755-61.
291. Winkelstein, J.A., *The role of complement in the host's defense against Streptococcus pneumoniae*. Rev Infect Dis, 1981. **3**(2): p. 289-98.
292. Musher, D.M., *Infections caused by Streptococcus pneumoniae: clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment*. Clinical Infectious Diseases, 1992. **14**(4): p. 801-7.
293. Abeyta, M., G.G. Hardy, and J. Yother, *Genetic alteration of capsule type but not PspA type affects accessibility of surface-bound complement and surface antigens of Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun, 2003. **71**(1): p. 218-25.
294. Hostetter, M.K., *Serotypic variations among virulent pneumococci in deposition and degradation of covalently bound C3b: implications for phagocytosis and antibody production*. J Infect Dis, 1986. **153**(4): p. 682-93.
295. AlonsoDeVelasco, E., et al., *Streptococcus pneumoniae: virulence factors, pathogenesis, and vaccines*. Microbiol Rev, 1995. **59**(4): p. 591-603.

296. Burgess, T.S., et al., *Commonly invasive serotypes of Streptococcus pneumoniae trigger a reduced innate immune response compared with serotypes rarely responsible for invasive infection*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2008. **53**(1): p. 136-9.
297. Wartha, F., et al., *Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect Streptococcus pneumoniae against neutrophil extracellular traps*. Cell Microbiol, 2007. **9**(5): p. 1162-71.
298. Kelly, T., J.P. Dillard, and J. Yother, *Effect of genetic switching of capsular type on virulence of Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun, 1994. **62**(5): p. 1813-9.
299. Nesin, M., M. Ramirez, and A. Tomasz, *Capsular transformation of a multidrug-resistant Streptococcus pneumoniae in vivo*. J Infect Dis, 1998. **177**(3): p. 707-13.
300. Benton, K.A., J.C. Paton, and D.E. Briles, *Differences in virulence for mice among Streptococcus pneumoniae strains of capsular types 2, 3, 4, 5, and 6 are not attributable to differences in pneumolysin production*. Infect Immun, 1997. **65**(4): p. 1237-44.
301. Morgan, P.J., et al., *Subunit organisation and symmetry of pore-forming, oligomeric pneumolysin*. FEBS Lett, 1995. **371**(1): p. 77-80.
302. Tilley, S.J., et al., *Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin*. Cell, 2005. **121**(2): p. 247-56.
303. Braun, J.S., et al., *Pneumococcal pneumolysin and H(2)O(2) mediate brain cell apoptosis during meningitis*. J Clin Invest, 2002. **109**(1): p. 19-27.
304. Stringaris, A.K., et al., *Neurotoxicity of pneumolysin, a major pneumococcal virulence factor, involves calcium influx and depends on activation of p38 mitogen-activated protein kinase*. Neurobiol Dis, 2002. **11**(3): p. 355-68.
305. Mitchell, T.J., et al., *Complement activation and antibody binding by pneumolysin via a region of the toxin homologous to a human acute-phase protein*. Mol Microbiol, 1991. **5**(8): p. 1883-8.
306. Paton, J.C., B. Rowan-Kelly, and A. Ferrante, *Activation of human complement by the pneumococcal toxin pneumolysin*. Infect Immun, 1984. **43**(3): p. 1085-7.
307. Rubins, J.B. and E.N. Janoff, *Pneumolysin: a multifunctional pneumococcal virulence factor*. J Lab Clin Med, 1998. **131**(1): p. 21-7.
308. Berry, A.M., et al., *Contribution of autolysin to virulence of Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun, 1989. **57**(8): p. 2324-30.
309. Berry, A.M., et al., *Reduced virulence of a defined pneumolysin-negative mutant of Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun, 1989. **57**(7): p. 2037-42.
310. Canvin, J.R., et al., *The role of pneumolysin and autolysin in the pathology of pneumonia and septicemia in mice infected with a type 2 pneumococcus*. J Infect Dis, 1995. **172**(1): p. 119-23.
311. Kadioglu, A., et al., *Host cellular immune response to pneumococcal lung infection in mice*. Infect Immun, 2000. **68**(2): p. 492-501.
312. Kadioglu, A., et al., *The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease*. Nat Rev Microbiol, 2008. **6**(4): p. 288-301.
313. Paton, J.C., et al., *Molecular analysis of the pathogenicity of Streptococcus pneumoniae: the role of pneumococcal proteins*. Annu Rev Microbiol, 1993. **47**: p. 89-115.
314. Perez-Dorado, I., S. Galan-Bartual, and J.A. Hermoso, *Pneumococcal surface proteins: when the whole is greater than the sum of its parts*. Mol Oral Microbiol, 2012. **27**(4): p. 221-45.
315. Andersson, B., et al., *Identification of an active disaccharide unit of a glycoconjugate receptor for pneumococci attaching to human pharyngeal epithelial cells*. J Exp Med, 1983. **158**(2): p. 559-70.

316. Cundell, D.R., et al., *Peptide permeases from Streptococcus pneumoniae affect adherence to eucaryotic cells*. Infect Immun, 1995. **63**(7): p. 2493-8.
317. Wizemann, T.M., et al., *Peptide methionine sulfoxide reductase contributes to the maintenance of adhesins in three major pathogens*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(15): p. 7985-90.
318. Spellerberg, B., et al., *Pyruvate oxidase, as a determinant of virulence in Streptococcus pneumoniae*. Mol Microbiol, 1996. **19**(4): p. 803-13.
319. Cundell, D.R., et al., *Streptococcus pneumoniae anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor*. Nature, 1995. **377**(6548): p. 435-8.
320. Ring, A., J.N. Weiser, and E.I. Tuomanen, *Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway*. J Clin Invest, 1998. **102**(2): p. 347-60.
321. Elm, C., et al., *Characterization of the interaction of the pneumococcal surface protein SpsA with the human polymeric immunoglobulin receptor (hplgR)*. Indian J Med Res, 2004. **119** **Suppl**: p. 61-5.
322. Hammerschmidt, S., et al., *Species-specific binding of human secretory component to SpsA protein of Streptococcus pneumoniae via a hexapeptide motif*. Mol Microbiol, 2000. **36**(3): p. 726-36.
323. Zhang, J.R., et al., *The polymeric immunoglobulin receptor translocates pneumococci across human nasopharyngeal epithelial cells*. Cell, 2000. **102**(6): p. 827-37.
324. Romero-Steiner, S., et al., *Inhibition of pneumococcal adherence to human nasopharyngeal epithelial cells by anti-PsaA antibodies*. Clin Diagn Lab Immunol, 2003. **10**(2): p. 246-51.
325. Anderton, J.M., et al., *E-cadherin is a receptor for the common protein pneumococcal surface adhesin A (PsaA) of Streptococcus pneumoniae*. Microb Pathog, 2007. **42**(5-6): p. 225-36.
326. Shivshankar, P., et al., *The Streptococcus pneumoniae adhesin PsrP binds to Keratin 10 on lung cells*. Mol Microbiol, 2009. **73**(4): p. 663-79.
327. Hilleringmann, M., et al., *Pneumococcal pili are composed of protofilaments exposing adhesive clusters of Rrg A*. PLoS Pathog, 2008. **4**(3): p. e1000026.
328. Podgorski, I. and B.F. Sloane, *Loss of caspase-8 in tumor cells: mechanism to overcome integrin-mediated death?* Mol Interv, 2006. **6**(3): p. 132-6.
329. Aziz-Seible, R.S. and C.A. Casey, *Fibronectin: functional character and role in alcoholic liver disease*. World J Gastroenterol, 2011. **17**(20): p. 2482-99.
330. Kadioglu, A., et al., *Pneumococcal protein PavA is important for nasopharyngeal carriage and development of sepsis*. Mol Oral Microbiol, 2010. **25**(1): p. 50-60.
331. Antikainen, J., et al., *Enolases from Gram-positive bacterial pathogens and commensal lactobacilli share functional similarity in virulence-associated traits*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2007. **51**(3): p. 526-34.
332. Izore, T., et al., *Structural basis of host cell recognition by the pilus adhesin from Streptococcus pneumoniae*. Structure, 2010. **18**(1): p. 106-15.
333. Yamaguchi, M., et al., *PfbA, a novel plasmin- and fibronectin-binding protein of Streptococcus pneumoniae, contributes to fibronectin-dependent adhesion and antiphagocytosis*. J Biol Chem, 2008. **283**(52): p. 36272-9.
334. Pracht, D., et al., *PavA of Streptococcus pneumoniae modulates adherence, invasion, and meningeal inflammation*. Infect Immun, 2005. **73**(5): p. 2680-9.
335. Mann, B., et al., *Multifunctional role of choline binding protein G in pneumococcal pathogenesis*. Infect Immun, 2006. **74**(2): p. 821-9.

336. King, S.J., K.R. Hippe, and J.N. Weiser, *Deglycosylation of human glycoconjugates by the sequential activities of exoglycosidases expressed by Streptococcus pneumoniae*. Mol Microbiol, 2006. **59**(3): p. 961-74.
337. Pluvinaige, B., et al., *Inhibition of the pneumococcal virulence factor StrH and molecular insights into N-glycan recognition and hydrolysis*. Structure, 2011. **19**(11): p. 1603-14.
338. Ponnuraj, K. and M.J. Jedrzejewski, *Mechanism of hyaluronan binding and degradation: structure of Streptococcus pneumoniae hyaluronate lyase in complex with hyaluronic acid disaccharide at 1.7 Å resolution*. J Mol Biol, 2000. **299**(4): p. 885-95.
339. Xu, G., et al., *Three Streptococcus pneumoniae sialidases: three different products*. J Am Chem Soc, 2011. **133**(6): p. 1718-21.
340. Willis, L.M., et al., *Mechanistic investigation of the endo-alpha-N-acetylgalactosaminidase from Streptococcus pneumoniae R6*. Biochemistry, 2009. **48**(43): p. 10334-41.
341. Abbott, D.W., et al., *Streptococcus pneumoniae endohexosaminidase D, structural and mechanistic insight into substrate-assisted catalysis in family 85 glycoside hydrolases*. J Biol Chem, 2009. **284**(17): p. 11676-89.
342. Oggioni, M.R., et al., *Pneumococcal zinc metalloproteinase ZmpC cleaves human matrix metalloproteinase 9 and is a virulence factor in experimental pneumonia*. Mol Microbiol, 2003. **49**(3): p. 795-805.
343. Van den Steen, P.E., et al., *Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2002. **37**(6): p. 375-536.
344. Lottenberg, R., C.C. Broder, and M.D. Boyle, *Identification of a specific receptor for plasmin on a group A streptococcus*. Infect Immun, 1987. **55**(8): p. 1914-8.
345. Sanderson-Smith, M.L., et al., *Bacterial plasminogen receptors: mediators of a multifaceted relationship*. J Biomed Biotechnol, 2012. **2012**: p. 272148.
346. Figuera, L., A. Gomez-Arreaza, and L. Avilan, *Parasitism in optima forma: Exploiting the host fibrinolytic system for invasion*. Acta Trop, 2013.
347. Dano, K., et al., *Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer*. Adv Cancer Res, 1985. **44**: p. 139-266.
348. Plow, E.F., et al., *The cell biology of the plasminogen system*. FASEB J, 1995. **9**(10): p. 939-45.
349. Ellis, V., M.F. Scully, and V.V. Kakkar, *Plasminogen activation initiated by single-chain urokinase-type plasminogen activator. Potentiation by U937 monocytes*. J Biol Chem, 1989. **264**(4): p. 2185-8.
350. Vieira, M.L., et al., *In vitro identification of novel plasminogen-binding receptors of the pathogen Leptospira interrogans*. PLoS One, 2010. **5**(6): p. e11259.
351. Sanderson-Smith, M.L., et al., *The plasminogen-binding group A streptococcal M protein-related protein Prp binds plasminogen via arginine and histidine residues*. J Bacteriol, 2007. **189**(4): p. 1435-40.
352. Derbise, A., et al., *Role of the C-terminal lysine residues of streptococcal surface enolase in Glu- and Lys-plasminogen-binding activities of group A streptococci*. Infect Immun, 2004. **72**(1): p. 94-105.
353. Pancholi, V. and V.A. Fischetti, *A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity*. J Exp Med, 1992. **176**(2): p. 415-26.
354. Attali, C., et al., *Streptococcus pneumoniae choline-binding protein E interaction with plasminogen/plasmin stimulates migration across the extracellular matrix*. Infect Immun, 2008. **76**(2): p. 466-76.

355. Papasergi, S., et al., *Plasminogen- and fibronectin-binding protein B is involved in the adherence of Streptococcus pneumoniae to human epithelial cells*. J Biol Chem, 2010. **285**(10): p. 7517-24.
356. Agarwal, V., et al., *Streptococcus pneumoniae endopeptidase O (PepO) is a multifunctional plasminogen- and fibronectin-binding protein, facilitating evasion of innate immunity and invasion of host cells*. J Biol Chem, 2013. **288**(10): p. 6849-63.
357. Bergmann, S., et al., *alpha-Enolase of Streptococcus pneumoniae is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface*. Mol Microbiol, 2001. **40**(6): p. 1273-87.
358. Bergmann, S., M. Rohde, and S. Hammerschmidt, *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of Streptococcus pneumoniae is a surface-displayed plasminogen-binding protein*. Infect Immun, 2004. **72**(4): p. 2416-9.
359. Jensch, I., et al., *PavB is a surface-exposed adhesin of Streptococcus pneumoniae contributing to nasopharyngeal colonization and airways infections*. Mol Microbiol, 2010. **77**(1): p. 22-43.
360. Eberhard, T., G. Kronvall, and M. Ullberg, *Surface bound plasmin promotes migration of Streptococcus pneumoniae through reconstituted basement membranes*. Microb Pathog, 1999. **26**(3): p. 175-81.
361. Attali, C., et al., *The interaction of Streptococcus pneumoniae with plasmin mediates transmigration across endothelial and epithelial monolayers by intercellular junction cleavage*. Infect Immun, 2008. **76**(11): p. 5350-6.
362. Duane, P.G., et al., *Identification of hydrogen peroxide as a Streptococcus pneumoniae toxin for rat alveolar epithelial cells*. Infect Immun, 1993. **61**(10): p. 4392-7.
363. Wani, J.H., et al., *Identification, cloning, and sequencing of the immunoglobulin A1 protease gene of Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun, 1996. **64**(10): p. 3967-74.
364. Weiser, J.N., et al., *Antibody-enhanced pneumococcal adherence requires IgA1 protease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 4215-20.
365. Puyet, A., B. Greenberg, and S.A. Lacks, *Genetic and structural characterization of endA. A membrane-bound nuclease required for transformation of Streptococcus pneumoniae*. J Mol Biol, 1990. **213**(4): p. 727-38.
366. Janulczyk, R., et al., *Hic, a novel surface protein of Streptococcus pneumoniae that interferes with complement function*. J Biol Chem, 2000. **275**(47): p. 37257-63.
367. Duthy, T.G., et al., *The human complement regulator factor H binds pneumococcal surface protein PspC via short consensus repeats 13 to 15*. Infect Immun, 2002. **70**(10): p. 5604-11.
368. Jarva, H., et al., *The group B streptococcal beta and pneumococcal Hic proteins are structurally related immune evasion molecules that bind the complement inhibitor factor H in an analogous fashion*. J Immunol, 2004. **172**(5): p. 3111-8.
369. Iannelli, F., et al., *Pneumococcal surface protein C contributes to sepsis caused by Streptococcus pneumoniae in mice*. Infect Immun, 2004. **72**(5): p. 3077-80.
370. Dieudonne-Vatran, A., et al., *Clinical isolates of Streptococcus pneumoniae bind the complement inhibitor C4b-binding protein in a PspC allele-dependent fashion*. J Immunol, 2009. **182**(12): p. 7865-77.
371. Agarwal, V., et al., *Enolase of Streptococcus pneumoniae binds human complement inhibitor C4b-binding protein and contributes to complement evasion*. J Immunol, 2012. **189**(7): p. 3575-84.
372. Tu, A.H., et al., *Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun, 1999. **67**(9): p. 4720-4.

373. Ren, B., et al., *The virulence function of Streptococcus pneumoniae surface protein A involves inhibition of complement activation and impairment of complement receptor-mediated protection*. J Immunol, 2004. **173**(12): p. 7506-12.
374. Adamou, J.E., et al., *Identification and characterization of a novel family of pneumococcal proteins that are protective against sepsis*. Infect Immun, 2001. **69**(2): p. 949-58.
375. Loisel, E., et al., *Biochemical characterization of the histidine triad protein PhtD as a cell surface zinc-binding protein of pneumococcus*. Biochemistry, 2011. **50**(17): p. 3551-8.
376. Melin, M., et al., *Interaction of pneumococcal histidine triad proteins with human complement*. Infect Immun, 2010. **78**(5): p. 2089-98.
377. Piatigorsky, J. and G.J. Wistow, *Enzyme/crystallins: gene sharing as an evolutionary strategy*. Cell, 1989. **57**(2): p. 197-9.
378. Hendriks, W., et al., *Duck lens epsilon-crystallin and lactate dehydrogenase B4 are identical: a single-copy gene product with two distinct functions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(19): p. 7114-8.
379. Wistow, G.J., et al., *Tau-crystallin/alpha-enolase: one gene encodes both an enzyme and a lens structural protein*. J Cell Biol, 1988. **107**(6 Pt 2): p. 2729-36.
380. Wistow, G.J. and J. Piatigorsky, *Lens crystallins: the evolution and expression of proteins for a highly specialized tissue*. Annu Rev Biochem, 1988. **57**: p. 479-504.
381. Fujii, Y., et al., *Purification and characterization of rho-crystallin from Japanese common bullfrog lens*. J Biol Chem, 1990. **265**(17): p. 9914-23.
382. Tomarev, S.I., R.D. Zinovieva, and J. Piatigorsky, *Characterization of squid crystallin genes. Comparison with mammalian glutathione S-transferase genes*. J Biol Chem, 1992. **267**(12): p. 8604-12.
383. Zinovieva, R.D., S.I. Tomarev, and J. Piatigorsky, *Aldehyde dehydrogenase-derived omega-crystallins of squid and octopus. Specialization for lens expression*. J Biol Chem, 1993. **268**(15): p. 11449-55.
384. Piatigorsky, J., et al., *Gene sharing by delta-crystallin and argininosuccinate lyase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(10): p. 3479-83.
385. Jeffery, C.J., *Moonlighting proteins*. Trends Biochem Sci, 1999. **24**(1): p. 8-11.
386. Gancedo, C. and C.L. Flores, *Moonlighting proteins in yeasts*. Microbiol Mol Biol Rev, 2008. **72**(1): p. 197-210, table of contents.
387. Sriram, G., et al., *Single-gene disorders: what role could moonlighting enzymes play?* Am J Hum Genet, 2005. **76**(6): p. 911-24.
388. Moore, B., *Bifunctional and moonlighting enzymes: lighting the way to regulatory control*. Trends Plant Sci, 2004. **9**(5): p. 221-8.
389. Gregory, T.R., *Synergy between sequence and size in large-scale genomics*. Nat Rev Genet, 2005. **6**(9): p. 699-708.
390. Jacob, F., *Evolution and tinkering*. Science, 1977. **196**(4295): p. 1161-6.
391. Chen, X.J., et al., *Aconitase couples metabolic regulation to mitochondrial DNA maintenance*. Science, 2005. **307**(5710): p. 714-7.
392. Lu, M., et al., *Physical interaction between aldolase and vacuolar H⁺-ATPase is essential for the assembly and activity of the proton pump*. J Biol Chem, 2007. **282**(34): p. 24495-503.
393. Yuan, W., et al., *Glucose-induced microautophagy in Pichia pastoris requires the alpha-subunit of phosphofructokinase*. J Cell Sci, 1997. **110** (Pt 16): p. 1935-45.
394. Decker, B.L. and W.T. Wickner, *Enolase activates homotypic vacuole fusion and protein transport to the vacuole in yeast*. J Biol Chem, 2006. **281**(20): p. 14523-8.

395. Kim, J.W. and C.V. Dang, *Multifaceted roles of glycolytic enzymes*. Trends Biochem Sci, 2005. **30**(3): p. 142-50.
396. Fothergill-Gilmore, L.A. and P.A. Michels, *Evolution of glycolysis*. Prog Biophys Mol Biol, 1993. **59**(2): p. 105-235.
397. Baker, H.V., *GCR1 of Saccharomyces cerevisiae encodes a DNA binding protein whose binding is abolished by mutations in the CTTCC sequence motif*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(21): p. 9443-7.
398. Ozimek, P., et al., *Pyruvate carboxylase is an essential protein in the assembly of yeast peroxisomal oligomeric alcohol oxidase*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(2): p. 786-97.
399. Babady, N.E., et al., *Cryptic proteolytic activity of dihydrolipoamide dehydrogenase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(15): p. 6158-63.
400. Ozimek, P., et al., *Hansenula polymorpha and Saccharomyces cerevisiae Pex5p's recognize different, independent peroxisomal targeting signals in alcohol oxidase*. FEBS Lett, 2006. **580**(1): p. 46-50.
401. Waterham, H.R., et al., *Peroxisomal targeting, import, and assembly of alcohol oxidase in Pichia pastoris*. J Cell Biol, 1997. **139**(6): p. 1419-31.
402. Zhao, B., et al., *Crystal structure of albaflavenone monooxygenase containing a moonlighting terpene synthase active site*. J Biol Chem, 2009. **284**(52): p. 36711-9.
403. Maxwell, R., *Glycolysis part 2*. Biology Online Learning Opportunity, 2012.
404. Lahteenmaki, K., P. Kuusela, and T.K. Korhonen, *Bacterial plasminogen activators and receptors*. FEMS Microbiol Rev, 2001. **25**(5): p. 531-52.
405. Pancholi, V. and V.A. Fischetti, *alpha-enolase, a novel strong plasmin(ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci*. J Biol Chem, 1998. **273**(23): p. 14503-15.
406. Redlitz, A., et al., *The role of an enolase-related molecule in plasminogen binding to cells*. Eur J Biochem, 1995. **227**(1-2): p. 407-15.
407. Bergmann, S., et al., *Identification of a novel plasmin(ogen)-binding motif in surface displayed alpha-enolase of Streptococcus pneumoniae*. Mol Microbiol, 2003. **49**(2): p. 411-23.
408. Cork, A.J., et al., *Defining the structural basis of human plasminogen binding by streptococcal surface enolase*. J Biol Chem, 2009. **284**(25): p. 17129-37.
409. Candela, M., et al., *Bifidobacterial enolase, a cell surface receptor for human plasminogen involved in the interaction with the host*. Microbiology, 2009. **155**(Pt 10): p. 3294-303.
410. Kesimer, M., et al., *Identification of salivary mucin MUC7 binding proteins from Streptococcus gordonii*. BMC Microbiol, 2009. **9**: p. 163.
411. Ge, J., D.M. Catt, and R.L. Gregory, *Streptococcus mutans surface alpha-enolase binds salivary mucin MG2 and human plasminogen*. Infect Immun, 2004. **72**(11): p. 6748-52.
412. Carneiro, C.R., et al., *Identification of enolase as a laminin-binding protein on the surface of Staphylococcus aureus*. Microbes and Infection, 2004. **6**(6): p. 604-8.
413. Castaldo, C., et al., *Surface displaced alfa-enolase of Lactobacillus plantarum is a fibronectin binding protein*. Microb Cell Fact, 2009. **8**: p. 14.
414. Spurbeck, R.R. and C.G. Arvidson, *Lactobacillus jensenii surface-associated proteins inhibit Neisseria gonorrhoeae adherence to epithelial cells*. Infect Immun, 2010. **78**(7): p. 3103-11.
415. Veiga-Malta, I., et al., *Enolase from Streptococcus sobrinus is an immunosuppressive protein*. Cell Microbiol, 2004. **6**(1): p. 79-88.
416. Antunez, K., et al., *Paenibacillus larvae enolase as a virulence factor in honeybee larvae infection*. Vet Microbiol, 2011. **147**(1-2): p. 83-9.

417. Sengupta, S., S. Ghosh, and V. Nagaraja, *Moonlighting function of glutamate racemase from Mycobacterium tuberculosis: racemization and DNA gyrase inhibition are two independent activities of the enzyme*. *Microbiology*, 2008. **154**(Pt 9): p. 2796-803.
418. Commichau, F.M., et al., *Novel activities of glycolytic enzymes in Bacillus subtilis: interactions with essential proteins involved in mRNA processing*. *Mol Cell Proteomics*, 2009. **8**(6): p. 1350-60.
419. Feltcher, M.E. and M. Braunstein, *Emerging themes in SecA2-mediated protein export*. *Nat Rev Microbiol*, 2012. **10**(11): p. 779-89.
420. Palmer, T. and B.C. Berks, *The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway*. *Nat Rev Microbiol*, 2012. **10**(7): p. 483-96.
421. Reddy, V.M. and F.G. Suleman, *Mycobacterium avium-superoxide dismutase binds to epithelial cell aldolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and cyclophilin A*. *Microb Pathog*, 2004. **36**(2): p. 67-74.
422. Harth, G. and M.A. Horwitz, *Export of recombinant Mycobacterium tuberculosis superoxide dismutase is dependent upon both information in the protein and mycobacterial export machinery. A model for studying export of leaderless proteins by pathogenic mycobacteria*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(7): p. 4281-92.
423. Braunstein, M., et al., *SecA2 functions in the secretion of superoxide dismutase A and in the virulence of Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*, 2003. **48**(2): p. 453-64.
424. Lenz, L.L., et al., *SecA2-dependent secretion of autolytic enzymes promotes Listeria monocytogenes pathogenesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(21): p. 12432-7.
425. Lottenberg, R., et al., *Cloning, sequence analysis, and expression in Escherichia coli of a streptococcal plasmin receptor*. *J Bacteriol*, 1992. **174**(16): p. 5204-10.
426. Winram, S.B. and R. Lottenberg, *The plasmin-binding protein Plr of group A streptococci is identified as glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*. *Microbiology*, 1996. **142** (Pt 8): p. 2311-20.
427. Pancholi, V. and V.A. Fischetti, *Regulation of the phosphorylation of human pharyngeal cell proteins by group A streptococcal surface dehydrogenase: signal transduction between streptococci and pharyngeal cells*. *J Exp Med*, 1997. **186**(10): p. 1633-43.
428. Jin, H., et al., *Group A streptococcal surface GAPDH, SDH, recognizes uPAR/CD87 as its receptor on the human pharyngeal cell and mediates bacterial adherence to host cells*. *J Mol Biol*, 2005. **350**(1): p. 27-41.
429. Terao, Y., et al., *Multifunctional glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of Streptococcus pyogenes is essential for evasion from neutrophils*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(20): p. 14215-23.
430. Madureira, P., et al., *Streptococcus agalactiae GAPDH is a virulence-associated immunomodulatory protein*. *J Immunol*, 2007. **178**(3): p. 1379-87.
431. Nagata, H., et al., *Identification of the binding domain of Streptococcus oralis glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase for Porphyromonas gingivalis major fimbriae*. *Infect Immun*, 2009. **77**(11): p. 5130-8.
432. Quessy, S., et al., *Description of an albumin binding activity for Streptococcus suis serotype 2*. *FEMS Microbiol Lett*, 1997. **147**(2): p. 245-50.
433. Brassard, J., M. Gottschalk, and S. Quessy, *Cloning and purification of the Streptococcus suis serotype 2 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and its involvement as an adhesin*. *Vet Microbiol*, 2004. **102**(1-2): p. 87-94.

434. Goji, N., A.A. Potter, and J. Perez-Casal, *Characterization of two proteins of Staphylococcus aureus isolated from bovine clinical mastitis with homology to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*. Vet Microbiol, 2004. **99**(3-4): p. 269-79.
435. Kinoshita, H., et al., *Cell surface Lactobacillus plantarum LA 318 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) adheres to human colonic mucin*. J Appl Microbiol, 2008. **104**(6): p. 1667-74.
436. Ramiah, K., C.A. van Reenen, and L.M. Dicks, *Surface-bound proteins of Lactobacillus plantarum 423 that contribute to adhesion of Caco-2 cells and their role in competitive exclusion and displacement of Clostridium sporogenes and Enterococcus faecalis*. Res Microbiol, 2008. **159**(6): p. 470-5.
437. Alvarez, R.A., M.W. Blaylock, and J.B. Baseman, *Surface localized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of Mycoplasma genitalium binds mucin*. Mol Microbiol, 2003. **48**(5): p. 1417-25.
438. Egea, L., et al., *Role of secreted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the infection mechanism of enterohemorrhagic and enteropathogenic Escherichia coli: interaction of the extracellular enzyme with human plasminogen and fibrinogen*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(6): p. 1190-203.
439. Aguilera, L., et al., *Secretion of the housekeeping protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by the LEE-encoded type III secretion system in enteropathogenic Escherichia coli*. Int J Biochem Cell Biol, 2012. **44**(6): p. 955-62.
440. Pasztor, L., et al., *Staphylococcal major autolysin (Atl) is involved in excretion of cytoplasmic proteins*. J Biol Chem, 2010. **285**(47): p. 36794-803.
441. Oliveira, L., et al., *Group B streptococcus GAPDH is released upon cell lysis, associates with bacterial surface, and induces apoptosis in murine macrophages*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e29963.
442. D'Costa, S.S., T.G. Romer, and M.D. Boyle, *Analysis of expression of a cytosolic enzyme on the surface of Streptococcus pyogenes*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **278**(3): p. 826-32.
443. Antikainen, J., et al., *pH-dependent association of enolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of Lactobacillus crispatus with the cell wall and lipoteichoic acids*. J Bacteriol, 2007. **189**(12): p. 4539-43.
444. Ling, E., et al., *Glycolytic enzymes associated with the cell surface of Streptococcus pneumoniae are antigenic in humans and elicit protective immune responses in the mouse*. Clin Exp Immunol, 2004. **138**(2): p. 290-8.
445. Young, K.C., et al., *Plasminogen activation by streptokinase via a unique mechanism*. J Biol Chem, 1998. **273**(5): p. 3110-6.
446. Cederholm-Williams, S.A., *Concentration of plasminogen and antiplasmin in plasma and serum*. J Clin Pathol, 1981. **34**(9): p. 979-81.
447. Boel, G., H. Jin, and V. Pancholi, *Inhibition of cell surface export of group A streptococcal anchorless surface dehydrogenase affects bacterial adherence and antiphagocytic properties*. Infect Immun, 2005. **73**(10): p. 6237-48.
448. Agarwal, V., et al., *An Alternative Role of C1q in Bacterial Infections: Facilitating Streptococcus pneumoniae Adherence and Invasion of Host Cells*. J Immunol, 2013.
449. Chung, M.C., et al., *Bacillus anthracis interacts with plasmin(ogen) to evade C3b-dependent innate immunity*. PLoS One, 2011. **6**(3): p. e18119.
450. Wang, G., et al., *The Roles of Moonlighting Proteins in Bacteria*. Curr Issues Mol Biol, 2013. **16**(2): p. 15-22.
451. Terrasse, R., et al., *Human and pneumococcal cell surface glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) proteins are both ligands of human C1q protein*. J Biol Chem, 2012. **287**(51): p. 42620-33.

452. Mellroth, P., et al., *LytA, major autolysin of Streptococcus pneumoniae, requires access to nascent peptidoglycan*. J Biol Chem, 2012. **287**(14): p. 11018-29.
453. Huberts, D.H. and I.J. van der Klei, *Moonlighting proteins: an intriguing mode of multitasking*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1803**(4): p. 520-5.
454. Bally, I., et al., *Expression of recombinant human complement C1q allows identification of the C1r/C1s-binding sites*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(21): p. 8650-5.

Annexes

Annexe 1 : Liste des oligonucléotides utilisés pour cette étude

| Oligonucléotides utilisés pour la construction des mutants HBt | |
|--|--|
| 1 | gapa-HBt-F 5'-GAATACTTCGCAAAAGATTGCTAAAATTGTCTTGTGGCCCTGGTATCCCTTCTTCTTAATCAATTGGATGGTGA CCTCGAAGC-3' |
| 2 | gapa-HBt-R 5'-GCTTCGAGGTCACCATCCATTGAATTAAAGAAAAGAAAGCA TAA CCAAGGCCAACAAGAA CAATTTTACCAATCTTTGCGAAGTATTTC-3' |
| 3 | gapa-F 5'-GCTTGGCTCCAA TGGCTAAA GCTC-3' |
| 4 | HBt-cat-R 5'-TCAAACA AATTTTCATCAAGCTTTTAAAGAAA GAA GAA GCA TAACCA GGGC-3' |
| 5 | HBt-cat-F 5'-GGCCCTGGTTATGCTTCTTCTTCTTAAAAGCTTGA TGAAA AATTTGTTGA-3' |
| 6 | cat-down-R 5'-GCTTTTCTATCAACTCAAGAATTATCTAGAACTAGTGGATCCCCGGG-3' |
| 7 | cat-down-F 5'-CCGGGGGATCCAGTTCATAGTTCATAGTAATTTCTTGA GTTGA TA GAAAGC-3' |
| 8 | down-R 5'-GCCAAA AATCCTTTTATCCTGGCC-3' |
| 9 | ctrl-F 5'-CACTCCTCCTGGTGGAAAACGA CG-3' |
| 10 | ctrl-R 5'-CCATGTCAGTACCTATATGTTGGCC-3' |
| Oligonucléotides utilisés pour l'insertion de mutations ponctuelles dans la GAPDH du pneumocoque | |
| 11 | GAPDHSpn-K115AK116A-F 5'-CTGAAAAAACA CTTAAAAGGTGAGGTACGACGGTTGTATCACTGCTCTGGTGGAAAAC-3' |
| 12 | GAPDHSpn-K115AK116A-R 5'-GTTTCCACCA GGA GCA GTGATTAACAA CGCTGCTA GCTCCACTTTAAGGTGTTTTCAG-3' |
| 13 | GAPDHSpn-D126AK128A-F 5'-TTATCACTGCTCTGGTGA AACGGCGTTGACAACA GTTGTATTCACA CTAACCA CGAC-3' |
| 14 | GAPDHSpn-D126AK128A-R 5'-GTGTTGGTTA GTGTTGAATACAA CTGTTGCAA CGGGGTTTCCACCA GGA GCA GTGATAA-3' |
| 15 | GAPDHSpn-Q164AN166A-F 5'-TTGGCTCCATGGCTAAAAGCTCTTGCAGACGGCTTTGGTGTGTTGAAGGA TTGATGAC-3' |
| 16 | GAPDHSpn-Q164AN166A-R 5'-GTCA TCAATCTTTCACAACA CCAAAA GCGGTCTGCAAGACTTTAGCCA TTGGA GCCAA-3' |
| 17 | GAPDHSpn-K344A-F 5'-CAAACTAAA GTTCTTGA CGTTGACGGTGCACA ATTGTTAAA GTTGTATCATGGT ACG-3' |
| 18 | GAPDHSpn-K304A-R 5'-CGTACCATGATACAACTTTAAACCAATTGTGACCGTCAACGTCAGA GAACTTTA GTTTG-3' |

Annexe 2 : Liste des peptides synthétisés pour cette étude

| | Séquence du peptide synthétique |
|----|---------------------------------|
| 1 | VKVGI NGFGR IGRLA FRRIQ |
| 2 | IGRLA FRRIQ NVEGV EVTRI |
| 3 | NVEGV EVTRI NDLTD PVMLA |
| 4 | NDLTD PVMLA HLLKY DTTQG |
| 5 | HLLKY DTTQG RFDGT VEVKE |
| 6 | RFDGT VEVKE GGFEV NGKFI |
| 7 | GGFEV NGKFI KVSAAE RDPEQ |
| 8 | KVSAAE RDPEQ IDWAT DGVEI |
| 9 | IDWAT DGVEI VLEAT GFFAK |
| 10 | VLEAT GFFAK KEAAE KHLKG |
| 11 | KEAAE KHLKG GAKKV VITAP |
| 12 | GAKKV VITAP GGNDV KTVVF |
| 13 | GGNDV KTVVF NTNHD VLDGT |
| 14 | NTNHD VLDGT ETVIS GASCT |
| 15 | ETVIS GASCT TNCLA PMAKA |
| 16 | TNCLA PMAKA LQDNF GVVEG |
| 17 | LQDNF GVVEG LMTTI HAYTG |
| 18 | LMTTI HAYTG DQMIL DGPHR |
| 19 | DQMIL DGPHR GGDLR RARAG |
| 20 | GGDLR RARAG AANIV PNSTG |
| 21 | AANIV PNSTG AAKAI GLVIP |
| 22 | AAKAI GLVIP ELNGK LDGSA |
| 23 | ELNGK LDGSA QRVPT PTGSV |
| 24 | QRVPT PTGSV TELVA VLEKN |
| 25 | TELVA VLEKN VTVDE VNAAM |
| 26 | VTVDE VNAAM KAASN ESYGY |
| 27 | KAASN ESYGY TEDPI VSSDI |
| 28 | TEDPI VSSDI VGMSY GSLFD |
| 29 | VGMSY GSLFD ATQTK VLDVD |
| 30 | ATQTK VLDVD GKQLV KVVSW |
| 31 | GKQLV KVVSW YDNEM SYTAQ |
| 32 | YDNEM SYTAQ LVRTL EYFAK |
| 33 | LVRTL EYFAK IAK |

Communications écrites

Streptococcus pneumoniae GAPDH is released by cell lysis and interacts with peptidoglycan.

Terrasse R, Amoroso A, Vernet T, Di Guilmi AM.

mBio. Soumis

Human and pneumococcal cell surface glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) proteins are both ligands of human C1q protein.

Terrasse R, Tacnet-Delorme P, Moriscot C, Pérard J, Schoehn G, Vernet T, Thielens NM, Di Guilmi AM, Frachet P.

Journal of Biological Chemistry. 2012 Dec 14;287(51):42620-33. doi: 10.1074/jbc.M112.423731. Epub 2012 Oct 18.

Structural basis of host cell recognition by the pilus adhesin from Streptococcus pneumoniae.

Izoré T, Contreras-Martel C, El Mortaji L, Manzano C, Terrasse R, Vernet T, Di Guilmi AM, Dessen A.

Structure. 2010 Jan 13;18(1):106-15. doi: 10.1016/j.str.2009.10.019.

Stability and assembly of pilus subunits of Streptococcus pneumoniae.

El Mortaji L, Terrasse R, Dessen A, Vernet T, Di Guilmi AM.

Journal of Biological Chemistry. 2010 Apr 16;285(16):12405-15. doi: 10.1074/jbc.M109.082776. Epub 2010 Feb 10.

Human and Pneumococcal Cell Surface Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH) Proteins Are Both Ligands of Human C1q Protein^{*[S]}

Received for publication, October 1, 2012. Published, JBC Papers in Press, October 18, 2012, DOI 10.1074/jbc.M112.423731

Rémi Terrasse^{†§¶1,2}, Pascale Tacnet-Delorme^{§¶1}, Christine Moriscot^{§¶**}, Julien Pérard^{§¶††}, Guy Schoehn^{§¶**}, Thierry Vernet^{†§¶}, Nicole M. Thielens^{§¶¶}, Anne Marie Di Guilmi^{†§¶‡‡}, and Philippe Frachet^{§¶¶§§}

From the [†]Pneumococcus (PG), [¶]Immune Response to Pathogens and Altered Self (IRPAS), and ^{**}Methods and Electron Microscopy (MEM) Groups, Université Joseph Fourier Grenoble 1, [§]CNRS, and [¶]Commissariat à l'Energie Atomique, Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, 38027 Grenoble, France and ^{††}Université Joseph Fourier (UJF), Unit for Virus Host Cell Interaction, UMI 3265 CNRS-European Molecular Biology Laboratory-UJF, 38042 Grenoble, France

Background: C1q is a major molecule of the immune innate system. GAPDH exposed at the surface of cells is associated with the virulence of pathogens.

Results: C1q binds GAPDH on human apoptotic and on pneumococcal cells.

Conclusion: GAPDH is a C1q ligand. Pneumococcal GAPDH-C1q interaction leads to complement activation.

Significance: This might bring new insights into host defense against pathogens.

C1q, a key component of the classical complement pathway, is a major player in the response to microbial infection and has been shown to detect noxious altered-self substances such as apoptotic cells. In this work, using complementary experimental approaches, we identified the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a C1q partner when exposed at the surface of human pathogenic bacteria *Streptococcus pneumoniae* and human apoptotic cells. The membrane-associated GAPDH on HeLa cells bound the globular regions of C1q as demonstrated by pulldown and cell surface co-localization experiments. Pneumococcal strains deficient in surface-exposed GAPDH harbored a decreased level of C1q recognition when compared with the wild-type strains. Both recombinant human and pneumococcal GAPDHs interacted avidly with C1q as measured by surface plasmon resonance experiments ($K_D = 0.34\text{--}2.17\text{ nM}$). In addition, GAPDH-C1q complexes were observed by transmission electron microscopy after cross-linking. The purified pneumococcal GAPDH protein activated C1 in an *in vitro* assay unlike the human form. Deposition of C1q, C3b, and C4b from human serum at the surface of pneumococcal cells was dependent on the presence of surface-exposed GAPDH. This ability of C1q to sense both human and bacterial GAPDHs

sheds new insights on the role of this important defense collagen molecule in modulating the immune response.

The soluble defense collagen C1q, as a major actor of the classical complement pathway, plays a crucial role in the response to microbial infection. However, its importance has been reinforced by the discoveries of its capacities to detect a wide variety of noxious altered-self substances such as β -amyloid fibrils, the pathological form of the prion protein, apoptotic and necrotic cells, or modified forms of the low density lipoprotein (1–8). Interestingly, unlike the other complement proteins, C1q is produced by macrophages and immature dendritic cells. Numerous studies have shown that C1q influences the phagocyte “status” through regulation of cytokine expression (7, 8), and it may be involved in the non-immunogenic presentation of self-antigens through its ability to modulate maturation of dendritic cells (9). C1q globular regions (GRs)⁵ mediate the binding to various molecules exposed at the surface of apoptotic cells such as phosphatidylserine, DNA, calreticulin, and annexins A2 and A5 (10–15). Opsonization with C1q facilitates the phagocytosis of pathogens and apoptotic cells, leading to different and appropriate adaptive responses (proinflammatory/immunogenic *versus* anti-inflammatory/tolerogenic). Consequently, pathogens might recruit C1q to subvert the host immune response by exploiting tolerance. To test this hypothesis, we looked for C1q ligands present at the surface of apoptotic cells that could be shared by pathogens.

The pathogen model used in this study is *Streptococcus pneumoniae*, a leading cause of meningitis, septicemia, and pneumonia responsible worldwide for the death of around 1 million children under 5 years of age every year (16). The nasopharynx of small children constitutes the normal habitat for pneumococci, and asymptomatic carriage usually occurs before and

* This work was supported in part by European Commission Grant LSHM-CT-2004-512138, Agence Nationale de la Recherche Grants PneumoPG and ANR-09-PIRIbio, and a grant from University Joseph Fourier-Grenoble (to P. F.).

[S] This article contains supplemental Fig. S1.

¹ Both authors contributed equally to this work.

² Supported by a Ph.D. grant from the Rhône-Alpes Region, Cluster Infectiologie.

³ To whom correspondence may be addressed: Pneumococcus Group (PG), Inst. de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1, France. Tel.: 33-4-38-78-56-34; Fax: 33-4-38-78-54-94; E-mail: anne-marie.di-guilmi@ibs.fr.

⁴ To whom correspondence may be addressed: Altered-Self Phagocytosis (ASP) Team, Immune Response to Pathogens and Altered Self (IRPAS) Group, Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1, France. Tel.: 33-4-38-78-41-37; Fax: 33-4-38-78-54-94; E-mail: philippe.frachet@ibs.fr.

⁵ The abbreviations used are: GR, globular region; Hsa, *Homo sapiens*; Spn, *S. pneumoniae*; HBT, hydrophobic tail.

during the development of invasive diseases. The transition from the asymptomatic state to infectious behavior of the pneumococcus is poorly understood but is likely to be dependent on the host's innate immune response. Within this context, the characterization of the immune response to *S. pneumoniae* is a high priority. One important component is the complement system among which the classical pathway is the dominant activation system, although the alternative and lectin pathways also play some roles (17–20). Data from experimental infections in mice have suggested that the classical pathway can be activated by various innate immune mediators. They include natural IgM, antibodies to capsular and noncapsular antigens, pentraxin components of the acute-phase response such as C-reactive protein and serum amyloid P component, and the macrophage lectin receptor SIGN-R1 (21). These data support the important role of the classical pathway for innate immunity to *S. pneumoniae* and suggest that different immune mediators act as bridging molecules by recognizing pneumococcus surface components and C1q. However, direct C1q ligands have yet to be identified at the surface of *S. pneumoniae*.

In the present study, we demonstrated that human and pneumococcal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases (named herein Hsa and Spn GAPDHs, respectively) exposed at the cell surface are C1q partners. Besides its well characterized function as a glycolytic enzyme, GAPDH displays multiple functions in membrane fusion, transcriptional coactivation, DNA repair, apoptosis induction and regulation, transferrin binding, and bacterial virulence (22–26). GAPDH is present on the surfaces of both prokaryotic and eukaryotic cells, but the mechanism by which the protein is secreted and/or captured at the cell surface is not known (27–29). In pathogenic bacteria, including *Streptococcus*, surface-anchored GAPDH is associated with virulence because of its ability to bind different host proteins (30–32). Pneumococcal surface-exposed GAPDH binds plasminogen. Conversion of plasminogen to the proteolytically active plasmin form plays important roles in pathological processes such as the escape from blood clots and tissue invasion (33–35). To our knowledge, this is the first report of GAPDH-C1q interaction taking place in a comparable manner for eukaryotic and prokaryotic homologs but leading to different functional consequences in terms of complement activation.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Proteins and Antibodies—C1q and the proenzyme C1s-C1r-C1r-C1s tetramer were purified from human serum and C1qGRs were prepared and quantified as described previously (36). Mouse monoclonal anti-human GAPDH (Invitrogen, clone 258), rabbit polyclonal anti-human GAPDH (Sigma G9545), anti-human C4 (Abcam ab48612), and anti-human C3 (Abcam ab97462) antibodies were used. Rabbit polyclonal antibodies directed against human C1q and pneumococcal GAPDH were from the Immune response to pathogens and altered self and *Pneumococcus* groups (Institut de Biologie Structurale-Grenoble), respectively. Native purified human GAPDH was from Advanced Immunochemical Inc.

Cell Culture—HeLa cells were cultivated in GlutaMAX DMEM (Invitrogen). Jurkat and THP-1 cells were cultivated in

GlutaMAX RPMI 1640 medium (Invitrogen). Medium was supplemented with 10% (v/v) FCS, 2.5 units/ml penicillin, and 2.5 mg/ml streptomycin. The cells were regularly tested for *Mycoplasma* contamination (Mycoalert detection kit, Lonza). Apoptosis was induced and quantified as described previously (12). Briefly, cells were exposed to 1,000 mJ/cm² UV-B irradiation at 312 nm in fresh medium. Cells were then incubated for the indicated times at 37 °C under 5% CO₂.

Pneumococcal Strains—*S. pneumoniae* R6 is a nonencapsulated avirulent strain derived from strain R36A, which itself is derived from the capsular type 2 clinical isolate strain D39. R36A has multiple interruptions in the type 2 capsular locus inherited from D39. The R6 and D39 hydrophobic tail (HBt) mutants were generated as addressed later. The wild-type (R6 and D39) and HBt mutant (R6 HBt and D39 HBt) strains were cultivated under anaerobic conditions in either Todd Hewitt broth (BD Biosciences) for the R6 strains or Todd Hewitt broth supplemented with 0.5% yeast extract for the D39 strains. Whenever required, pneumococci were labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC). A 10-ml bacterial culture in late exponential growth phase ($A_{600} \approx 0.6$) was harvested by centrifugation (10 min at 3,000 × g). Cells were washed with PBS before incubation with FITC at 1 mg/ml in 500 μl of PBS for 30 min at 4 °C. Bacteria were washed three times with PBS before use.

Isolation of HeLa Cell Surface Biotinylated Proteins—HeLa cell surface proteins were biotinylated as follow. Cells were washed two times with ice-cold PBS and biotinylated using biotinamidocaproate *N*-hydroxysuccinimide ester diluted in bicarbonate buffer (Amersham Biosciences). After incubation at 4 °C for 30 min with gentle shaking, cells were rinsed twice with ice-cold PBS to remove any remaining biotinylation reagent. The cells were then scraped and lysed in 1% Triton X-100, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ in PBS containing protease inhibitors (complete EDTA-free, Roche Diagnostics) and left at 4 °C for 1 h. Insoluble material was removed by centrifugation at 20,800 × g for 30 min at 4 °C. Soluble proteins present in the supernatant were quantified with a bicinchoninic acid assay (Sigma) and incubated with streptavidin-conjugated magnetic beads (Dynabeads MyOne Streptavidin T1, Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway) with rotation for 90 min at 4 °C. The beads were collected with a magnet and washed eight times with PBS, 0.1% Tween 20. Biotinylated proteins were eluted by boiling the beads with 40 μl of 2× Laemmli sample buffer for 5 min at 100 °C. The amount of biotinylated surface-exposed GAPDH was determined by Western blotting using an anti-human GAPDH antibody.

Preparation of HeLa Cell Plasma Membrane Proteins—Culture dishes (100 mm) of HeLa cells were harvested by scraping and incubated on ice for 20 min in hypotonic buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.6) containing protease inhibitors) and disrupted by Dounce homogenization. The homogenate was centrifuged at 3,000 × g for 10 min. The supernatant was collected and further centrifuged at 220,000 × g for 30 min. The cell membrane-containing pellet was then solubilized in PBS containing 1% Triton X-100, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, and protease inhibitors for 1 h at 4 °C. Solubilized membrane proteins

GAPDH Is a Novel C1q Ligand

were collected from the supernatant by 30-min centrifugation at $220,000 \times g$.

C1qGR Overlay Binding Assay—Solubilized membrane proteins (10 μ g) were subjected to electrophoresis using a 10% SDS-polyacrylamide gel and transferred to Immobilon-P membrane (Millipore). The membrane was subsequently blocked with 3% BSA in PBS, 0.1% Tween 20 at room temperature for 1 h and washed three times with PBS, 0.1% Tween 20. Putative streptavidin binding sites were blocked using a streptavidin/biotin blocking kit (SP-2002, Vector Laboratories). The membrane was washed briefly before incubation with biotinylated C1qGRs (2.5 μ g/ml) for 2 h (C1qGRs were biotinylated using the ECL protein biotin system (Amersham Biosciences) according to the manufacturer's instructions). After extensive washes, the membrane was incubated with streptavidin conjugated to horseradish peroxidase for 1 h, which allowed detection of the bound biotinylated C1qGRs by chemiluminescence (SuperSignal West Pico Chemiluminescent substrate, Pierce).

Pulldown Experiments—Biotinylated C1qGRs were added to 80 μ l of preequilibrated streptavidin-conjugated magnetic beads. The mixture was incubated for 30 min at room temperature with rotation. The beads were pelleted, and the supernatant was removed. After six washes with PBS, 1% BSA, the beads were incubated with plasma membrane proteins for 4 h at 4 °C with gentle rocking. The beads were then pelleted, and supernatants were collected. After seven washes with 0.1% Triton X-100, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 in PBS, bound proteins were eluted by addition of 40 μ l of 2 \times Laemmli sample buffer and incubated at 100 °C for 10 min. As a control, the same experiment was performed with 80 μ l of streptavidin magnetic beads not coupled to biotinylated C1qGRs or coupled to free biotin. Detection of GAPDH was performed by Western blotting using an anti-human GAPDH antibody.

Flow Cytometry—HeLa cells were harvested using trypsin-EDTA solution (Invitrogen). Cells (0.5×10^6 /ml) were washed twice, resuspended in PBS, fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature, and resuspended in PBS, 1% BSA. Monoclonal anti-human GAPDH antibody was diluted 1:250 and incubated with cells for 45 min on ice. An isotype antibody was used as a control. After two washes, cells were resuspended in PBS and incubated on ice for 30 min with FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) diluted 1:200 and analyzed with a FACScan flow cytometer using CellQuest software (BD Biosciences).

Production and Purification of Recombinant Pneumococcal and Human GAPDHs—Genomic DNA from the D39 strain of *S. pneumoniae* was used as a template to amplify the *gapdh* gene (Sp2012) by conventional PCR methodology. The resulting PCR product was cloned into the pLIM01 vector (PX Therapeutics SA, Grenoble, France) that had been modified from pQE80 by insertion of patented sequences, allowing a ligase-independent cloning procedure. The resulting construct, pLIM01/*gapdh*, encodes the full-length GAPDH protein fused to a His₆ tag at the N terminus. A tobacco etch virus protease cleavage site was inserted between the His₆ tag and the N-terminal sequence of GAPDH. DNA sequencing confirmed that no mutation had been introduced during PCR. The human GAPDH gene was amplified from cDNA (GAPDH, NCBI Ref-

erence Sequence NM_002046, human cDNA clone, Origene), and a tobacco etch virus cleavage site was introduced at the 5'-extremity. The resulting PCR product was cloned into the pETDuet vector (Novagen) to fuse a His₆ tag at the N terminus of the human GAPDH sequence. Overnight cultures of the *Escherichia coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL (Stratagene) strain transformed with the Hsa or Spn GAPDH expression constructs were used for inoculation with 500 ml of Terrific Broth medium (Euromedex) supplemented with 100 μ g/ml ampicillin and cultured at 37 °C for 3 h. Protein expression was induced with 0.5 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside for 16 h at 15 °C. After sonication and centrifugation of the lysate (20 min at $40,000 \times g$), recombinant Hsa and Spn GAPDH proteins were recovered from the soluble fraction and loaded onto a 1-ml prepacked HisTrap HP column (GE Healthcare). Column equilibration buffer was 50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 20 mM imidazole (pH 8.0). After extensive washing, recombinant proteins were eluted with 60, 100, 300, and 500 mM imidazole steps in 50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl (pH 8.0) buffer and subsequently dialyzed against 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 (pH 7.4) before use for biological assays. The degree of protein purity was checked by Coomassie Blue staining of SDS-polyacrylamide gels. Protein concentrations were determined by absorbance at 280 nm.

Construction of the HBt Mutant Pneumococcal Strains—The R6 and D39 HBt mutant strains were generated by insertion of a hydrophobic tail (IVLVGLVMLLS) at the 3'-end of the *gapdh* gene as described previously (37). Complementary primers used for insertion (QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis kit, Agilent Technologies) of this sequence in the pLIM01-rGAPDH vector were as follows: GAPDH-1, AATAC-TTCGCAAAGATTGCTAAAATTGTTCTTGTGGCCTG-TTATGCTTCTTCTTCTTAATCAATTGGATGGTGAC-CTCGAGCG; GAPDH-2, GCTCGAGGTCACCATCCAAT-TGATTAAGAAAGAAGAAGCATAACCAGGCCAACAA-GAACAATTTTAGCAATCTTTGCGAAGTATTC. To construct the recombination product, three overlapping fragments were PCR-amplified: 1) a 604-nucleotide fragment comprising the 3'-end of the *gapdh* gene, the hydrophobic tail, and the 5'-region of the *cat* gene (GAPDH-3, GCTTGGCTCCAATG-GCTAAAGCTC; GAPDH-4, TCAAACAAATTTTCATCA-AGCTTTAAGAAAGAAGAAGCATAACCAGGCC); 2) a 1084-nucleotide fragment comprising the *cat* gene, the 3'-end of the hydrophobic tail, and the sequence downstream of the *gapdh* gene (GAPDH-5, GGCCTGGTTATGCTTCTTCTT-TCTTAAAAGCTTGATGAAAATTGTTTGA; GAPDH-6, GCTTCTATCAACTCAAGAATTATCTAGAAGTAGTG-GATCCCCCGG-3'); and 3) a 552-nucleotide fragment comprising the sequence downstream of the *gapdh* gene overlapping the *cat* gene (GAPDH-7, CCGGGGATCCACTAGT-TCTAGATAATTCTTGAGTTGATAGAAAGC; GAPDH-8, GCCAAAATCCTTTTATCCTGCC). These three fragments were PCR-assembled using primers GAPDH-3 and GAPDH-8, and R6 or D39 strain competent cells were transformed with the recombination product and plated onto chloramphenicol-containing Columbia blood agar. Mutant strains were selected twice, and insertion was verified by PCR amplifications using primers flanking the recombination product.

Solid-phase Binding Assay—Solid-phase binding assays were performed to measure binding of Hsa and Spn GAPDH proteins to C1q and plasminogen. White 96-well microtiter plates (Greiner Bio One) were coated with 1 μ g of C1q, plasminogen (Roche Applied Science) or BSA as a control in 100 μ l of PBS at 4 °C overnight. Saturation was performed by adding 200 μ l/well PBS, 2% BSA for 1 h at room temperature. Five washes were performed using 200 μ l of PBS. The recombinant Hsa and Spn GAPDHs were added in each well (amounts ranging from 10 ng to 10 μ g), and the mixture was incubated for 2 h at room temperature. Five washes were performed using 200 μ l of PBS, 0.2% Tween. His-tagged bound Hsa and Spn GAPDH proteins were detected by adding 100 μ l/well horseradish peroxidase-conjugated anti-His antibody (Sigma) (1:1,000 dilution) in PBS, 0.03% Tween 20, 0.2% BSA for 1 h at room temperature. Four washes with 200 μ l of PBS, 0.2% Tween 20 were performed. ECL solution (Pierce) (100 μ l) was added to each well, and chemiluminescence was measured using a multiwell luminescence reader (Fluostar Optima, BMG Labtech).

Surface Plasmon Resonance Measurements—Surface plasmon resonance measurements were performed using a BIAcore 3000 instrument (GE Healthcare). C1q and its GRs were covalently immobilized to the dextran matrix of a CM5 sensor chip via the primary amine groups (amine coupling kit, GE Healthcare). The carboxymethylated dextran surface was activated by the injection of a mixture of 0.2 M *N*-ethyl-*N'*-(diethylaminopropyl)carbodiimide and 0.05 M *N*-hydroxysuccinimide. Ligands were injected in 10 mM sodium acetate buffer (pH 5.0). Ligand concentrations and contact time were adjusted according to the desired level of immobilization. The remaining *N*-hydroxysuccinimide esters were blocked by injection of 1 M ethanolamine hydrochloride (pH 8.5). All immobilization steps were performed at a flow rate of 10 μ l/min in 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% P20 (GE Healthcare) (pH 7.4). Immobilization levels for C1q and GR were 19,752 and 9,933 response units, respectively. No protein was immobilized on the control flow cell that underwent the activation and blocking steps. Binding experiments were performed at 25 °C at a flow rate of 30 μ l/min in 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 0.005% P20 (pH 7.4). Spn GAPDH was injected at different concentrations ranging from 1 to 10 nM, and Hsa GAPDH was injected at concentrations ranging from 5 to 50 nM. Data were double referenced by subtraction of the control flow cell signal and of a blank run (buffer only). In all experiments, association phases ran for 180 s, and dissociation phases ran for 300 s. The surface was regenerated with pulses of guanidinium chloride ranging from 0.1 to 1 M. Data were analyzed by global fitting to a 1:1 Langmuir binding model of both the association and the dissociation phases for several concentrations simultaneously using BIAevaluation 3.2 software (BIAcore). In each case, the data presented were obtained with a statistic χ^2 value <2. The apparent equilibrium dissociation constants (K_D) were calculated from the ratio of the dissociation and association rate constants (k_d/k_a).

Cross-linking Experiments—Soluble interactions between Hsa or Spn GAPDH and C1q were checked using a cross-linking strategy. 10, 50, and 100 μ g of GAPDH proteins were incubated with or without C1q (50 μ g) in 50 μ l of 10 mM HEPES, 150

mM NaCl, 2 mM CaCl₂ (pH 7.4) for 1 h at 4 °C. Glutaraldehyde was then added at a final concentration of 0.03%, and the incubation continued for 1 h at 4 °C. The cross-linking reaction was stopped by addition of 5 μ l of 1 M Tris-HCl (pH 8.0). The protein complexes were separated by SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane, and analyzed by Western blot using horseradish peroxidase-conjugated anti-His antibody (1:5,000 dilution; Sigma-Aldrich) and ECL solution (Pierce) as detection reagent.

Quantification of Pneumococcal Surface-exposed GAPDH—The amount of surface-exposed pneumococcal GAPDH was analyzed by an alkaline elution strategy. A 50-ml culture in late exponential growth phase ($A_{600} \approx 0.6$) was harvested by centrifugation (15 min at 3,000 $\times g$). The bacterial culture density was also measured by CFU counting on blood agar plates. The cells were resuspended in PBS to adjust the bacterial suspension to 1.5 $\times 10^9$, 3 $\times 10^9$, 7.5 $\times 10^9$, 1.5 $\times 10^{10}$, 2.25 $\times 10^{10}$, and 3 $\times 10^{10}$ CFU in 100 μ l of 100 mM carbonate (pH 10) buffer and incubated for 30 min at 37 °C. The suspensions were centrifuged, and the supernatants were collected, separated by SDS-PAGE, transferred on a nitrocellulose membrane, and analyzed by Western blot using rabbit anti-pneumococcal GAPDH antibody (1:5,000 dilution), horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (1:5,000 dilution; Sigma-Aldrich), and ECL solution (Pierce) as detection reagent. The intensity of the spots was quantified using ImageJ software. The amount of GAPDH in each sample was determined relative to the GAPDH released by the wild-type strain, used at the highest concentration, and this value was arbitrarily considered as 100%. If necessary, the intensity values were adjusted based on the CFU counting.

Pneumococcal Subcellular Fractionation—The amount of pneumococcal GAPDH in the different cell compartments of the wild-type and Hbt mutant strains was analyzed by cell fractionation. One-tenth of a 100-ml culture in late exponential growth phase ($A_{600} \approx 0.6$) was centrifuged (15 min at 3,000 $\times g$), and the pellet was resuspended in 1 ml of PBS containing 100 μ g/ml lysozyme and 50 units/ml mutanolysin and incubated for 2 h at 37 °C, yielding the whole cell lysate extract. The remaining 90 ml were centrifuged (15 min at 3,000 $\times g$), and the pellet was resuspended in 9 ml of PBS containing 100 μ g/ml lysozyme, 50 units/ml mutanolysin, and 30% sucrose and incubated for 2 h at 37 °C. This lysate was centrifuged, and the supernatant containing the cell wall was collected. The pelleted protoplasts were resuspended in 9 ml of 10 mM HEPES, 10 mM KCl (pH 7.4); lysed by three cycles of freezing/thawing; and ultracentrifuged for 45 min at 190,000 $\times g$. The soluble cytoplasm was collected, and the membrane pellet was resuspended in 9 ml of 10 mM HEPES, 10 mM KCl (pH 7.4). The different subcellular fractions were serially diluted, separated by SDS-PAGE, transferred on a nitrocellulose membrane, and analyzed by Western blot using rabbit anti-pneumococcal GAPDH antibody (1:5,000 dilution), horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (1:5,000 dilution; Sigma-Aldrich), and ECL solution (Pierce) as detection reagent. The intensity of the spots was quantified using ImageJ software.

Immunofluorescence Microscopy—HeLa cells cultivated on glass coverslips were washed in PBS, fixed for 5 min with 4%

GAPDH Is a Novel C1q Ligand

paraformaldehyde, incubated with 1% BSA, and then submitted to GAPDH and C1q detection by indirect immunofluorescence using a rabbit anti-C1q polyclonal antibody diluted 1:100 and a monoclonal anti-human GAPDH antibody diluted 1:250 in PBS. Bound antibodies were visualized with Cy3-conjugated goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) and Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit IgG diluted 1:250 in PBS. Cells were mounted on glass slides with Vectashield mounting medium for fluorescence with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Vector Laboratories). Cells were photographed using an epifluorescence Olympus IX81 microscope equipped with differential interference contrast (Nomarski) and a reproducible optical section acquisition system ($\Delta Z_{\text{min}} = 0.1 \mu\text{m}$) for three-dimensional reconstruction. To assess spatial localizations within the cell and at the surface, serial optical sections were taken at 0.5- μm intervals throughout the thickness of all cells examined. Volocity 6 software was used for analysis and treatment (deconvolution/restoration, co-localization, and quantification). Pearson's correlation coefficient was measured on each view to reinforce co-localization observations. Coefficients ≥ 0.75 were measured for all images shown.

Wild-type R6 pneumococcal strain was grown at an A_{600} of 0.3 and fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min in ice. Cells were then deposited onto poly-L-lysine-coated Poly Prep slides (Sigma-Aldrich) and permeabilized in cold methanol for 5 min. Slides were blocked for 30 min at room temperature with 5% (w/v) nonfat dry milk in PBS (saturation buffer) and then incubated for 1 h with anti-pneumococcal GAPDH antibody in saturation buffer. The slides were then washed twice in PBS and incubated with a 1:300 dilution of Cy2-conjugated goat anti-rabbit antibody in saturation buffer. After successive washes with PBS and water, cells were incubated with 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DAPI (Tebu-Bio) for 15 min or with 0.5 μl of FM4-64 (1 mg/ml; Molecular Probes). Slides were mounted with Mowiol and examined with an Olympus BX61 microscope equipped with an UPFLN 100 \times O-2PH/L3 objective and a QImaging Retiga-SRV 1394 cooled charge-coupled device camera. Image acquisition was performed using Volocity 6 software without any further picture processing.

Bacterial Binding Assay—Solid-phase binding assays were performed to measure binding of the R6 and D39 wild-type and HBt strains to C1q and plasminogen. Black 96-well microtiter plates (Greiner Bio One) were coated in triplicates with 1 μg of C1q, plasminogen, or BSA in PBS at 4 $^{\circ}\text{C}$ overnight. Saturation was performed by adding 200 $\mu\text{l}/\text{well}$ PBS, 2% BSA for 1 h at room temperature. Five washes were performed using 200 μl of PBS. 100 μl of FITC-labeled bacterial suspensions (3×10^7 , 7.5×10^7 , 1.5×10^8 , or 3×10^8 CFU/ml) were added to each well, and the mixture was incubated for 1 h at room temperature. Five washes were performed using 200 μl of PBS, 0.2% Tween 20. The bacterium-associated fluorescence was measured using a multiwell fluorescence reader (Fluostar Optima, BMG Labtech). Bacterial suspensions of the wild-type and HBt mutant strains were plated for CFU counting to control the bacterial density. The data were corrected according to the wild-type/HBt ratio: the binding level was related to the value

displayed by the wild-type strain, used at the highest concentration, and this value was arbitrarily considered as 100%.

Electron Microscopy Analysis—Isolated GAPDH and C1q samples at a concentration of approximately 0.05 mg/ml were applied to the clean side of carbon film on mica (carbon/mica interface) and negatively stained with 2% ammonium molybdate (pH 7.4). A grid was placed on top of the carbon film, which was subsequently air-dried. Images were taken under low dose conditions with a CM12 Phillips electron microscope at 120 kV and a calibrated nominal magnification of 45,000 using an ORIUS SC1000 charge-coupled device camera (Gatan, Inc.). Glutaraldehyde cross-linked complexes were also analyzed by EM. In addition, the recently described GraFix sample preparation technique was also used to obtain cross-linked C1q-GAPDH complexes (38). Briefly, the complexes were prepared by incubation of a 2:1 ratio mixture of GAPDH (0.1 mg/ml) and C1q (0.05 mg/ml) in 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 (pH 7.4) at room temperature for 30 min. 100 μl of the mixture was applied to a 0.5-ml 20–40% (v/v) glycerol, 0.033–0.1% (v/v) glutaraldehyde gradient. After centrifugation at 20,000 rpm in an SW55Ti rotor (Beckman Coulter) for 18 h at 4 $^{\circ}\text{C}$, 50- μl fractions were collected from the top of the gradient, and excess glutaraldehyde was inactivated by adding 5 μl of 1 M Tris to each fraction. To remove the maximal amount of glycerol, the carbon/sample was rinsed by plunging it into buffer without glycerol. Staining with ammonium molybdate took place after this step.

C1 Activation Assay—C1 activation was assayed as described previously (35). C1q (0.25 μM) and various amounts of GAPDH were mixed and incubated for 20 min at 37 $^{\circ}\text{C}$ before addition of equimolar amounts of the C1s-C1r-C1r-C1s tetramer (0.25 μM) to reconstitute the C1 complex. The mixture was then incubated for 20 min at 37 $^{\circ}\text{C}$ in 50 mM triethanolamine-HCl, 145 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 (pH 7.4). The reaction mixtures were submitted to SDS-PAGE analysis under reducing conditions using 10% acrylamide gels. The bands corresponding to C1s were revealed by Western blot analysis using a rabbit polyclonal antibody after electrotransfer to a nitrocellulose membrane. C1 activation was determined from the amounts of the A and B chains of activated C1s relative to that of the proenzyme. In a control experiment, it was verified that GAPDH does not activate the C1s-C1r-C1r-C1s tetramer in the absence of C1q.

Complement Deposition Assay—Complement deposition upon treatment with human serum was measured as follows. White 96-well microtiter plates (Greiner Bio One) were coated in triplicates with 10×10^6 R6 WT, D39 WT, R6 HBt, or D39 HBt bacteria in 100 μl of 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 (pH 7.4) (HBS-C buffer) for 2 h at room temperature. Saturation was achieved by adding 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ HBS-C, 0.2% gelatin for 1 h at room temperature. Human serum (100 μl ; 1:25 dilution) or HBS-C (100 μl) was added in each well and incubated for 1.5 h at room temperature. C1q, C4b, and C3b deposition was detected by adding 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ anti-C1q, anti-C4, or anti-C3 antibody (1:1,000 dilution) in HBS-C, 0.02% gelatin for 1 h at room temperature followed by 100 μl of horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (1:1,000 dilution) in HBS-C, 0.02% gelatin for 1 h at room temperature. ECL solution (Pierce) (100 μl) was added to each well, and chemilumi-

nescence was measured using a multiwell luminescence reader (Fluostar Optima, BMG Labtech). Two washes were performed with 100 μ l of HBS-C between each step.

RESULTS

The Human GAPDH Exposed at the Cell Surface Is a Novel C1qGR-binding Protein—GAPDH was initially detected by blot overlay on plasma membrane extracts using the C1q globular region as the bait (Fig. 1A). This experiment was designed to identify unknown cell surface C1q ligand(s) potentially involved in the recognition and the uptake of apoptotic cells by macrophages. When incubated with plasma membrane proteins extracted from viable and early apoptotic HeLa cells (triggered by UV-B irradiation), biotinylated C1qGR strongly revealed a 36-kDa band that showed slightly increased intensity with the development of apoptosis (Fig. 1A, lanes 2, 3, and 4 compared with lane 1). N-terminal protein sequencing analysis demonstrated unambiguously that this band corresponds to GAPDH (data not shown). Because GAPDH is a major and widely expressed protein in all human cells, complementary analyses were conducted to validate this initial observation. The presence of GAPDH on the surface of HeLa cells was confirmed after cell surface biotinylation, purification of the biotinylated proteins using streptavidin magnetic beads, and Western blotting using an antibody directed against human GAPDH (Fig. 1B). As expected, GAPDH was detected in the pellet fraction containing biotinylated surface proteins. The supernatant fractions correspond to the intracellular compartments in which GAPDH was present independently of the biotinylation procedure. Surface GAPDH expression was also investigated by flow cytometry on HeLa and Jurkat cells. The human monocyte THP-1 cell line was used as a control because it was published that macrophages express GAPDH at their surface (26). As shown in Fig. 1, C and D, all the cell lines exposed GAPDH at their surface. Intriguingly, HeLa and Jurkat cells appeared to display two distinct populations (negative (or low expressing) and positive populations for GAPDH surface expression). This unexpected result obtained with a monoclonal anti-human GAPDH antibody (Invitrogen) was confirmed using a rabbit polyclonal anti-GAPDH antibody (Sigma) (data not shown). Because membrane-anchored GAPDH increased with apoptosis development (Fig. 1A), we analyzed the GAPDH cell surface exposure up to 4 h after apoptosis induction (and before significant plasma membrane permeabilization) by FACS. As shown in Fig. 1D, a significant increase in the amount of surface-anchored GAPDH was detected on Jurkat cells. Finally, the GAPDH recognition by C1qGR was confirmed by pull-down experiments on solubilized plasma membrane proteins using biotinylated C1qGRs as the bait (Fig. 1E, lane 6). No GAPDH detection was obtained in the absence of C1qGR (Fig. 1E, lane 2) or using biotin alone (Fig. 1E, lane 4). Unlabeled C1q competed efficiently for the binding of GAPDH to biotinylated C1q (not shown). All together these results demonstrate that C1qGR binds to GAPDH present at the surface of human cells.

C1q and GAPDH Co-localize at the Surface of Apoptotic Cells—Based on the above observation, we questioned whether GAPDH could be a ligand of C1q involved in the recognition of apoptotic cells. To this end, co-localization experiments were

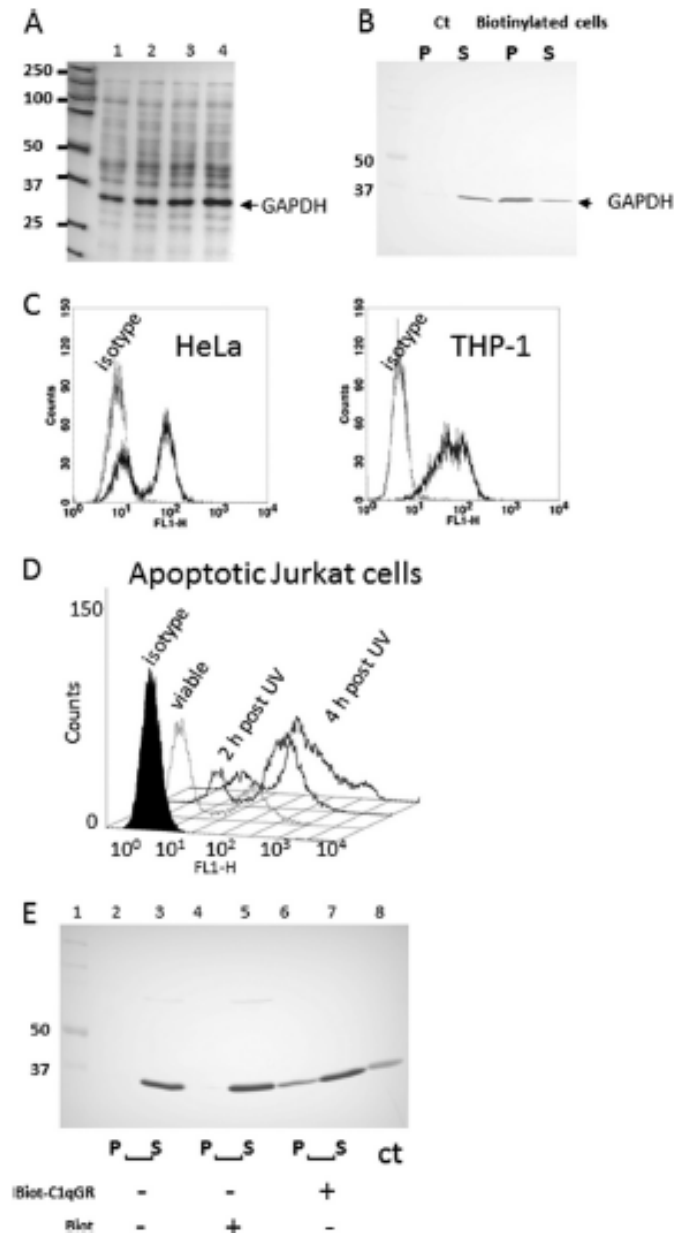


FIGURE 1. Human GAPDH is a ligand of the C1q globular region. A, protein overlay of membrane extracts of viable (lane 1) and apoptotic (2, 4, and 6 h post-UV irradiation, lanes 2, 3, and 4) HeLa cells using biotinylated C1qGR as a probe. The arrow points to a band with increasing intensity identified as GAPDH. B, GAPDH detection by Western blotting among biotinylated HeLa cell surface proteins. GAPDH is detected in the pellet containing biotinylated surface proteins linked to beads (P). The control (Ct) with non-biotinylated cells is shown. The supernatants (S) correspond to the intracellular non-biotinylated proteins. C and D, non-permeabilized HeLa, THP-1, and Jurkat cells were stained with anti-GAPDH or with an isotype control and analyzed by FACS. Viable and early apoptotic Jurkat cells are shown (D). FL1-H corresponds to the FITC fluorescence intensity. E, GAPDH pull-down experiment on plasma membrane extracts using biotinylated C1qGR (Biot-C1qGR) as the bait. GAPDH is only detected in the pellet (P) in the presence of C1qGR. Biot corresponds to the pull-down assay using free biotin. Supernatants of all pull-down conditions are shown. ct corresponds to purified GAPDH. The positions of molecular mass markers (expressed in kilodaltons) are shown (A, B, and E).

conducted on viable and apoptotic HeLa cells using either the globular region of C1q or the complete molecule. As illustrated in Fig. 2, GAPDH was detected at the cell surface on both viable and apoptotic HeLa cells (Fig. 2, C, H, M, and R) in agreement

GAPDH Is a Novel C1q Ligand

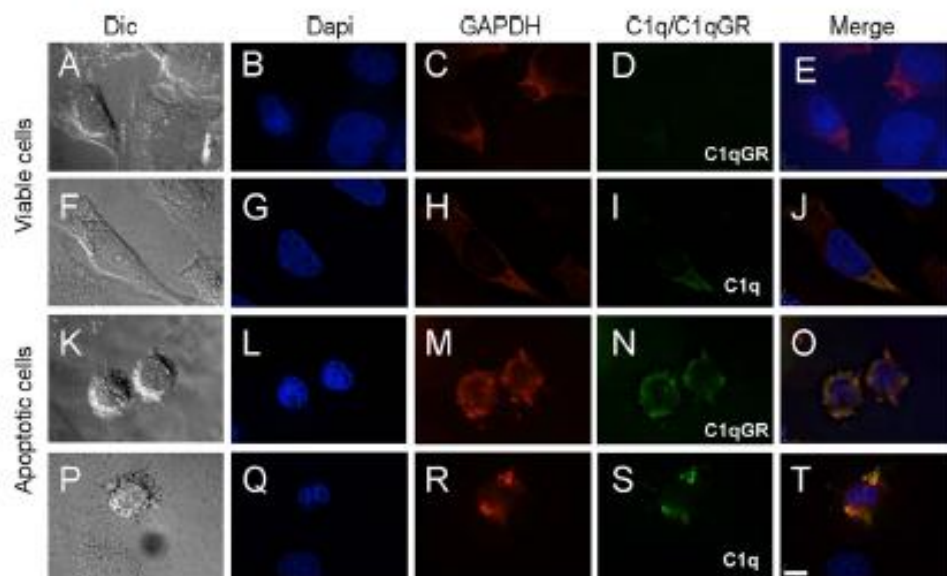


FIGURE 2. GAPDH and C1qGR co-localize on apoptotic plasma membrane blebs. Cells were submitted to double immunofluorescent labeling for GAPDH (red) and C1q or C1qGR (green) as described under "Experimental Procedures." Nuclei were labeled with DAPI (blue). In merged views, co-localization appears in yellow. A–J, untreated control HeLa cells. K–T, apoptotic cells (6 h post-UV irradiation). A, F, K, and P, differential interference contrast (Dic). C, H, M, and R, surface GAPDH. D, I, N, and S, C1q or C1qGR as specified. E, J, O, and T, merge views. Scale bar, 10 μ m.

with the cytometry experiment (Fig. 1C). Binding of C1q was detected on apoptotic cells (Fig. 2S) and to a lesser extent on non-apoptotic cells (Fig. 2I), whereas C1qGR binding was mainly detected on apoptotic cells (Fig. 2N). The co-localization was supported by Pearson's correlation coefficients measured on the merged images shown in Fig. 2, J, O, and T, as described under "Experimental Procedures." In conclusion, C1q and C1qGR mostly co-localize with GAPDH detected on the surface of apoptotic cells characterized by plasma membrane blebbing. GAPDH-C1q co-localization is not restricted to HeLa cells because we obtained similar results on apoptotic Jurkat cells (not shown).

Expression and Purification of Human and Pneumococcal GAPDH Proteins—To further investigate the C1q binding to human and bacterial GAPDHs, comparable production strategies were conducted to produce Hsa and Spn recombinant GAPDH proteins. The expression vectors used allowed production of the recombinant proteins fused to a histidine affinity tag. SDS-PAGE analysis of the purified recombinant proteins indicated that Hsa and Spn GAPDHs were essentially pure and exhibited apparent molecular masses of about 38 kDa under reducing conditions (data not shown) in accordance with the calculated and measured masses. Indeed, the molecular masses determined by MALDI-TOF analysis were $38,198 \pm 39$ and $38,193 \pm 9$ Da for Hsa and Spn GAPDH, respectively, consistent with the values predicted from the amino acid sequences after removal of the N-terminal methionine (38,198 and 38,180 Da, respectively). Transmission electron microscopy confirmed the homogeneity of the preparation and the tetrameric oligomerization state of both Hsa and Spn GAPDHs (see Fig. 5) (39–42).

Pneumococcal and Human GAPDHs Interact with C1q *In Vitro*—Spn and Hsa recombinant GAPDH proteins ranging from 0.01 to 10 μ g were incubated with coated C1q. Significant dose-dependent binding responses of both GAPDH proteins to

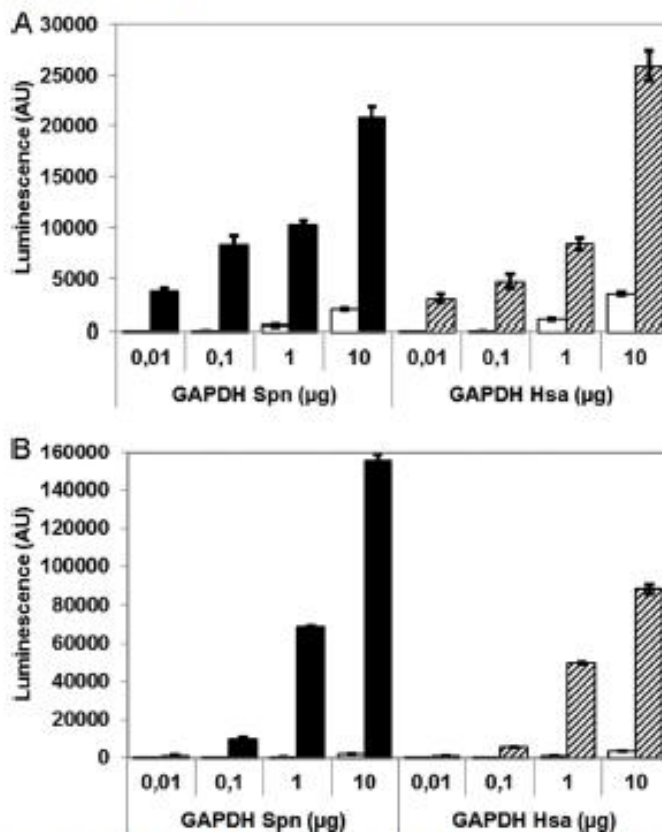


FIGURE 3. Binding of soluble pneumococcal and human GAPDHs to immobilized C1q and plasminogen by solid-phase assay. Different quantities of His-tagged GAPDH (from 0.01 to 10 μ g) were incubated for 1 h on 1 μ g of proteins (BSA, C1q, and plasminogen) coated on a 96-well plate (corresponding to 14.4, 2.12, and 11 pmol of proteins/well, respectively). Bound GAPDH proteins were detected by chemiluminescence reading (light measured between 240 and 740 nm) after extensive washes and incubation with horseradish peroxidase-conjugated anti-His antibody. Results are given in arbitrary units (AU). This assay was performed three times in triplicate wells. The average of three independent experiments \pm S.D. is shown. A, pneumococcal and human GAPDH interaction with C1q. B, pneumococcal and human GAPDH interaction with plasminogen. White bars correspond to coated BSA in A and B. Error bars correspond to S.D.

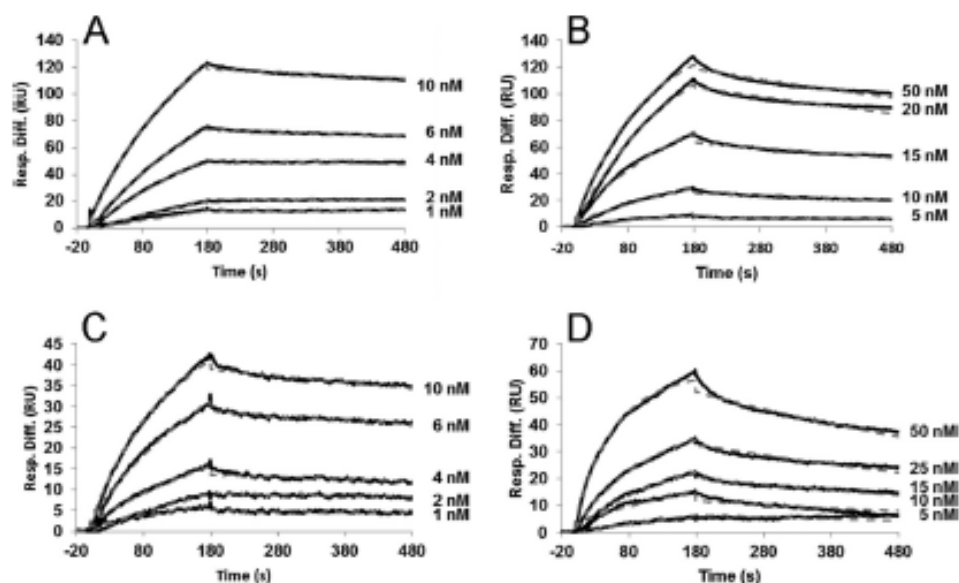


FIGURE 4. Surface plasmon resonance measurements of pneumococcal and human GAPDH protein interaction with C1q and its GR. Shown are binding of pneumococcal GAPDH (A) or human GAPDH (B) to C1q and binding of pneumococcal GAPDH (C) or human GAPDH (D) to C1qGR. C1q and GR proteins were immobilized on a Biacore CM5 sensor chip; GAPDH recombinant proteins were the analytes. Data represent overlays of sensorgrams resulting from the injection of different concentrations of GAPDH as indicated. The blank run was subtracted from each sensorgram. Fits are shown as dotted lines and were obtained by global fitting of the data using a 1:1 Langmuir binding model. The kinetic parameters of the interactions determined by recording sensorgrams at varying GAPDH concentrations are listed in Table 1. *Resp. Diff.*, response difference; *RU*, response units.

C1q were observed when compared with BSA used as negative control (Fig. 3A). Similar results were obtained with coated plasminogen used as a positive control, showing that human GAPDH, like its bacterial homolog, binds to plasminogen (Fig. 3B).

Human and Pneumococcal GAPDHs Bind to C1q Globular Region with High Affinity—Surface plasmon resonance experiments confirmed the interactions between GAPDH and C1q (Fig. 4). Interaction was first tested using two different human GAPDH proteins: a commercially available native form and a His-tagged recombinant form. We compared the C1q and the C1qGR interaction with both immobilized human GAPDHs. In this configuration, the K_D values determined using the simple 1:1 interaction model showed no significant differences between the native and recombinant human GAPDH forms (K_D of 4×10^{-7} and 3×10^{-7} M, respectively). In the reverse configuration with C1q immobilized on the sensor chip surface, binding of human and pneumococcal His-tagged recombinant GAPDH proteins was concentration-dependent (Fig. 4, A and B). The data fit to the simple 1:1 interaction model proposed by the BIAevaluation software from which kinetic parameters were calculated. However, because of oligomeric organizations of GAPDH (tetramer) and C1q (hexamer), the interaction likely results from global avidity recognition. Consequently, the K_D determinations correspond to apparent values (Table 1). The GAPDH binding to C1q is of high affinity because apparent K_D values in the nanomolar range were determined for Spn and Hsa GAPDHs (0.34 and 2.17 nM, respectively). Comparison of the association and dissociation rate constant values indicates that the pneumococcal protein forms a slightly more stable complex with C1q than the human GAPDH (Table 1). This effect was also observed using the reverse experimental configuration where the GAPDH proteins were immobilized and

TABLE 1

Kinetics and dissociation constants for the interaction between human and pneumococcal GAPDHs and C1q or its isolated GR

| Soluble analyte, GAPDH ^a | Immobilized ligand | |
|-------------------------------------|---|---|
| | C1q | GR |
| Pneumococcal | | |
| K_D (nM) | $0.34 \times 10^{-9} \pm 0.04 \times 10^{-9}$ | $0.73 \times 10^{-9} \pm 0.21 \times 10^{-9}$ |
| χ^2 | 0.59 ± 0.28 | 0.33 ± 0.15 |
| k_a (1/M s) | $6.51 \times 10^5 \pm 4.42 \times 10^4$ | $7.92 \times 10^5 \pm 1.32 \times 10^4$ |
| k_d (1/s) | $2.23 \times 10^{-4} \pm 4.29 \times 10^{-5}$ | $5.47 \times 10^{-4} \pm 8.62 \times 10^{-5}$ |
| Human | | |
| K_D (nM) | $2.17 \times 10^{-9} \pm 0.14 \times 10^{-9}$ | $4.40 \times 10^{-9} \pm 1.32 \times 10^{-9}$ |
| χ^2 | 1.48 ± 0.19 | 0.79 ± 0.01 |
| k_a (1/M s) | $3.16 \times 10^5 \pm 3.42 \times 10^4$ | $3.22 \times 10^5 \pm 9.29 \times 10^4$ |
| k_d (1/s) | $6.80 \times 10^{-4} \pm 2.67 \times 10^{-5}$ | $1.25 \times 10^{-3} \pm 2.22 \times 10^{-5}$ |

^a Binding of pneumococcal (1–10 nM) and human (5–50 nM) GAPDH was measured as described under "Experimental Procedures." The association (k_a) and dissociation (k_d) rate constants were determined using a 1:1 Langmuir binding model. The values shown are the means of at least three separate experiments \pm S.D.

C1q was used as the soluble analyte (data not shown). Both GAPDHs interacted with the C1qGR, although the apparent affinity was higher for the pneumococcal protein (0.73 nM) when compared with the value obtained with the human form (4.40 nM) (Table 1 and Fig. 4, C and D). As already observed with the whole molecule, the complex formed by Spn GAPDH and C1qGR was more stable than that involving the human protein (Table 1).

Pneumococcal and Human GAPDHs Form Complexes with C1q in Solution—Formation of the GAPDH-C1q complex in solution was analyzed by a cross-linking approach followed by Western blot detection (Fig. 5). Increasing quantities of GAPDH proteins were used (10, 50, and 100 μ g). The proteins migrated as monomeric forms in the absence of glutaraldehyde with an apparent molecular mass around 37 kDa in accordance with the calculated masses (Fig. 5, A and B). The migration

GAPDH Is a Novel C1q Ligand

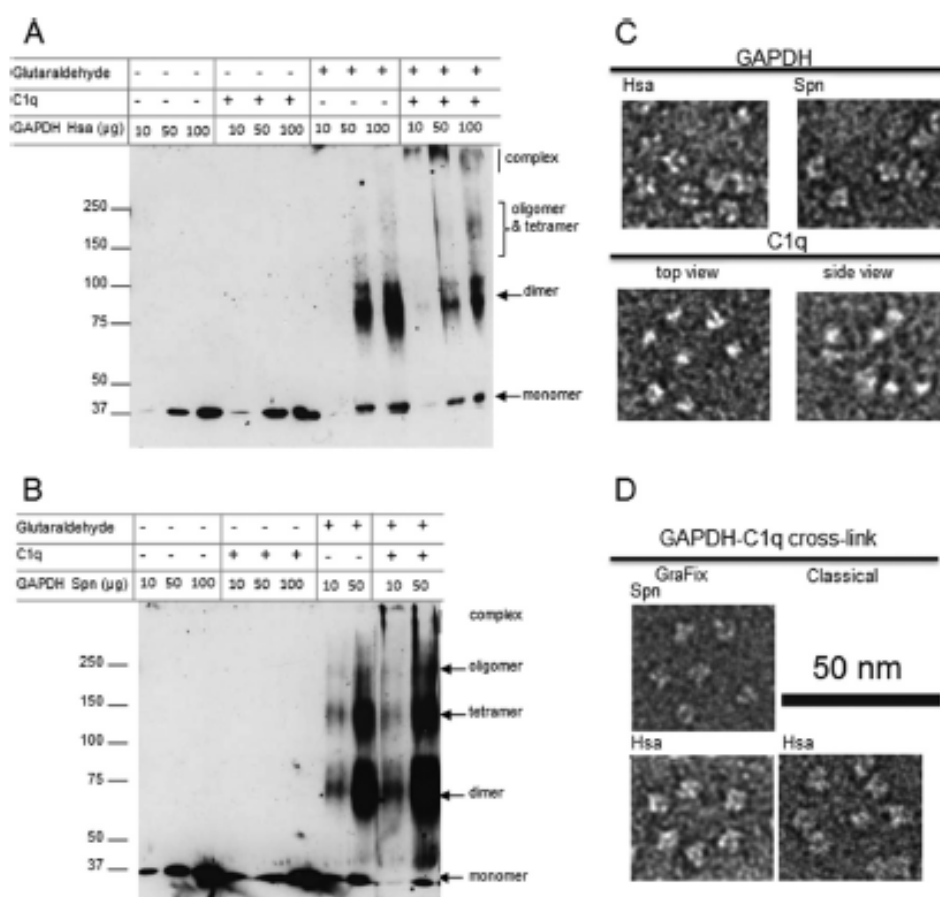


FIGURE 5. Cross-linked complexes of pneumococcal and human GAPDH proteins with C1q. Different quantities of human (A) and pneumococcal (B) GAPDH proteins (10, 50, and 100 µg) and 50 µg of C1q were used. Glutaraldehyde was added at a final concentration of 0.03%. The reactions were performed for 1 h on ice before loading on a 12.5% SDS-polyacrylamide gel. An anti-His mouse monoclonal antibody was used for Western blot detection of the His-tagged GAPDH proteins. The molecular mass markers are indicated on the left side of each blot. C, electron micrographs of isolated GAPDHs and C1q. D, selected top views of complexes of both proteins obtained after classical cross-linking or GraFix as specified. Samples were prepared as described under "Experimental Procedures."

pattern of the GAPDH proteins was not modified in the presence of C1q. Addition of glutaraldehyde induced the formation of dimers and multimers of human and pneumococcal GAPDHs (Fig. 5, A and B). In these experimental conditions, pneumococcal GAPDH generated significantly more tetramers and oligomers (Fig. 5B). In the presence of C1q, cross-linking led to the appearance of species of high molecular weight range corresponding to the complex formed between GAPDH and C1q. Taking into account that both GAPDHs form oligomers and that the C1q molecule has a molecular mass of 460 kDa, it is likely that the covalent association of both partners is heterogeneous in size, impairing determination of the stoichiometry of the complex.

Electron microscopy was used to further investigate the association between GAPDH and C1q. Purified recombinant human and pneumococcal GAPDHs have a tetrameric structure (Fig. 5C). Isolated C1q displays the classical hexameric structure resembling a bouquet of tulips (Fig. 5C). The top view clearly shows the six globular regions of the molecules organized around the stem. The Hsa GAPDH-C1q complex was deposited on electron microscopy grids directly after the cross-linking experiment (Fig. 5D, right) or after the GraFix procedure (38), a sample preparation protocol combining the sedi-

mentation of complexes through a glycerol gradient with mild chemical cross-linking (Fig. 5D, left). As shown in representative images corresponding to top views of C1q, complexes were clearly observed because GAPDH molecules characterized by their tetrameric-like structure are localized to each of the globular regions of C1q. Similar images were obtained from samples from GraFix and classical cross-linking experiments with human GAPDH. No difference was detected when comparing human and pneumococcal GAPDHs in complex with C1q.

Construction of *S. pneumoniae* Strains with Reduced Level of Surface-exposed GAPDH—The cellular localization of GAPDH was analyzed by immunofluorescence experiments. R6 *S. pneumoniae* was incubated with anti-GAPDH antibodies and with Cy2-conjugated secondary IgG. DNA and membranes were labeled with DAPI and FM4-64, respectively (Fig. 6A). Both merged images show that GAPDH is localized at the cell poles. Green GAPDH localization appears to be external to the red FM4-64 membrane labeling, indicating that GAPDH is associated with the cell surface (Fig. 6A).

Testing the physiological role of pneumococcal surface GAPDH requires the construction of a mutant strain with no or a limited amount of surface GAPDH. Because of its essential role in bacterial metabolism, the construction of a pneumococ-

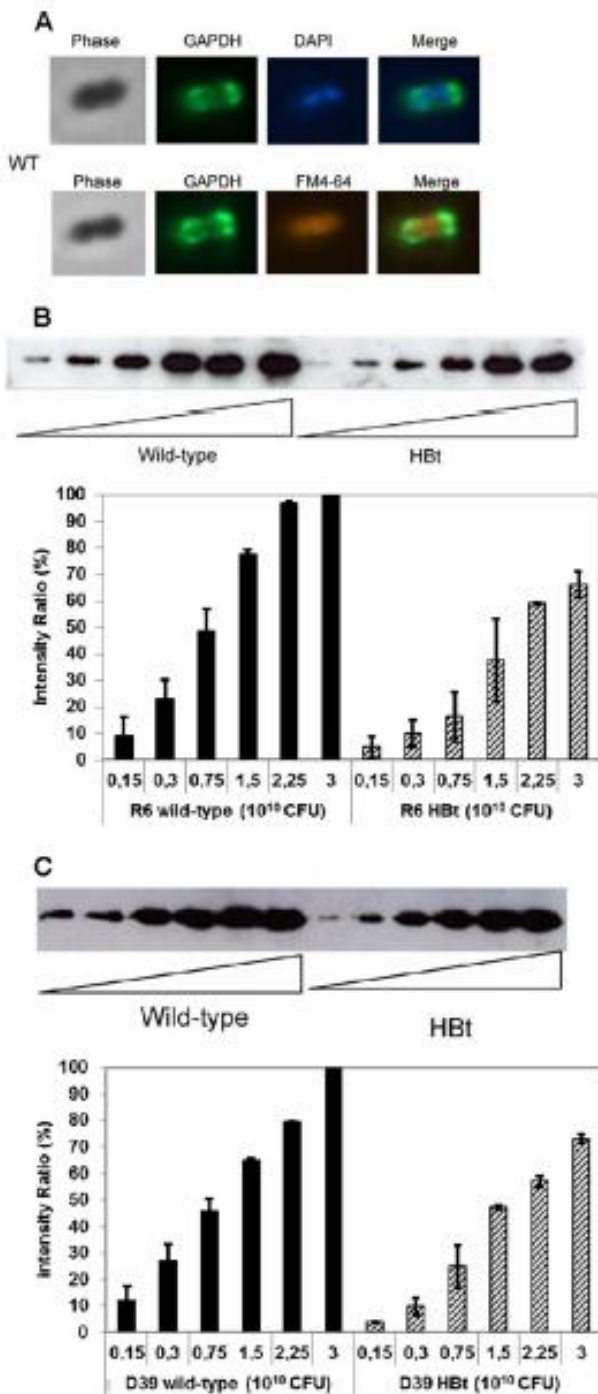


FIGURE 6. Inhibition of surface-exposed GAPDH in mutant pneumococcal strains. *A*, Immunofluorescence localization of GAPDH in *S. pneumoniae* R6 strain. Bacteria grown to exponential phase ($A_{600} \approx 0.3$) were deposited on slides, fixed, and incubated with rabbit polyclonal antibodies directed against pneumococcal GAPDH. Samples were then revealed with a secondary antibody coupled to Cy2. The bacterial chromosome was stained with DAPI, and the membrane was stained with FM4-64. *B* and *C*, quantification of pneumococcal GAPDH associated with the bacterial surface in wild-type and mutant strains. Bacterial suspensions of the R6 and D39 wild-type and mutant strains were prepared at increasing cell densities (CFU) as indicated below each histogram, and each of them was treated by alkaline pH to release GAPDH from the bacterial surface. The presence of GAPDH in the supernatant sample was detected by Western blot, and quantification of the chemiluminescence signals was performed. The ratios were calculated with respect to the parental strain maximal concentration (3×10^{10} CFU as 100%). The average of the three independent experiments is shown \pm S.D. *B*, R6 wild-type and HbT mutant strains. *C*, D39 wild-type and HbT mutant strains. Error bars correspond to S.D.

cal strain deleted for the gene encoding GAPDH would be lethal. To overcome this difficulty, we applied to *S. pneumoniae* the strategy developed in *S. pyogenes* that consists in inhibiting the export of the protein (37). A hydrophobic tail is inserted at the 3'-end of the *gapdh* gene in the genome, which will anchor the protein to the membrane, prevent the export, and retain the enzymatic activity in the cytoplasm. The insertion of the hydrophobic tail was performed in the R6 and D39 strains. The mutant strains are designated HbT. The localization and expression level of GAPDH in the wild-type and mutant strains were compared in the different cellular compartments of R6 and D39 strains (supplemental Fig. S1). We could demonstrate that GAPDH expression is comparable in total extracts of both wild-type and mutant strains. We calculated that the proportion of GAPDH associated with the membrane fraction in the R6 HbT strain was increased by 50% when compared with the wild type. Conversely, 83% less GAPDH was associated with the cell wall fraction in the R6 HbT strain when compared with the wild type. Similar data were obtained when comparing the wild-type and mutant D39 strains. Taken together, these results show that the fusion of a hydrophobic tail indeed reduces the quantity of GAPDH at the pneumococcal surface to about 50%.

A complementary procedure was developed to quantify the level of surface-exposed GAPDH. Bacterial suspensions prepared at increasing cell densities were treated by alkaline pH to release GAPDH from the bacterial surface. The presence of GAPDH in the supernatant samples was detected by Western blot (Fig. 6, *B* and *C*). The quantity of eluted GAPDH was correlated to the increasing cell density used (from 1.5×10^9 to 3×10^{10} CFU). Quantification of the chemiluminescence signals was performed. The values were adjusted based on the CFU counting for both strains and normalized to the value for the highest concentration of wild-type sample, which was considered as 100%. The mean difference between HbT mutant and wild-type strains was calculated: the R6 HbT strain displayed only 49% of the GAPDH normally expressed at the surface of the wild-type, and the D39 HbT strain displayed only 43%. These data are in accordance with the calculations based on the subcellular fractionation results (supplemental Fig. S1).

Native GAPDH Exposed at the Surface of the Pneumococcus Binds to C1q—The specific binding of FITC-labeled wild-type and mutant R6 and D39 strains to C1q was compared using a solid-phase assay (Fig. 7). Increasing the bacterial concentration of R6 strains led to a dose-dependent binding to C1q, which displayed lower intensity in the case of the HbT mutant strain (Fig. 7*A*). Although the mutant binding to C1q was decreased by 16 and 11% at 3×10^7 and 7.5×10^7 CFU/ml, respectively, when compared with the parental strain, the R6 HbT binding to C1q was decreased by 64 and 56% when used at 1.5×10^8 and 3×10^8 CFU/ml, respectively (Fig. 7*A*). Similar data were calculated from the analysis of the patterns of R6 wild-type and HbT strain binding to plasminogen (Fig. 7*B*). These results are in accordance with the half-decreased level of GAPDH exposed at the surface of the mutant strains. The less important decrease in binding of the R6 HbT strain to plasminogen compared with the binding to C1q might be explained by the presence of others plasminogen receptors like enolase and

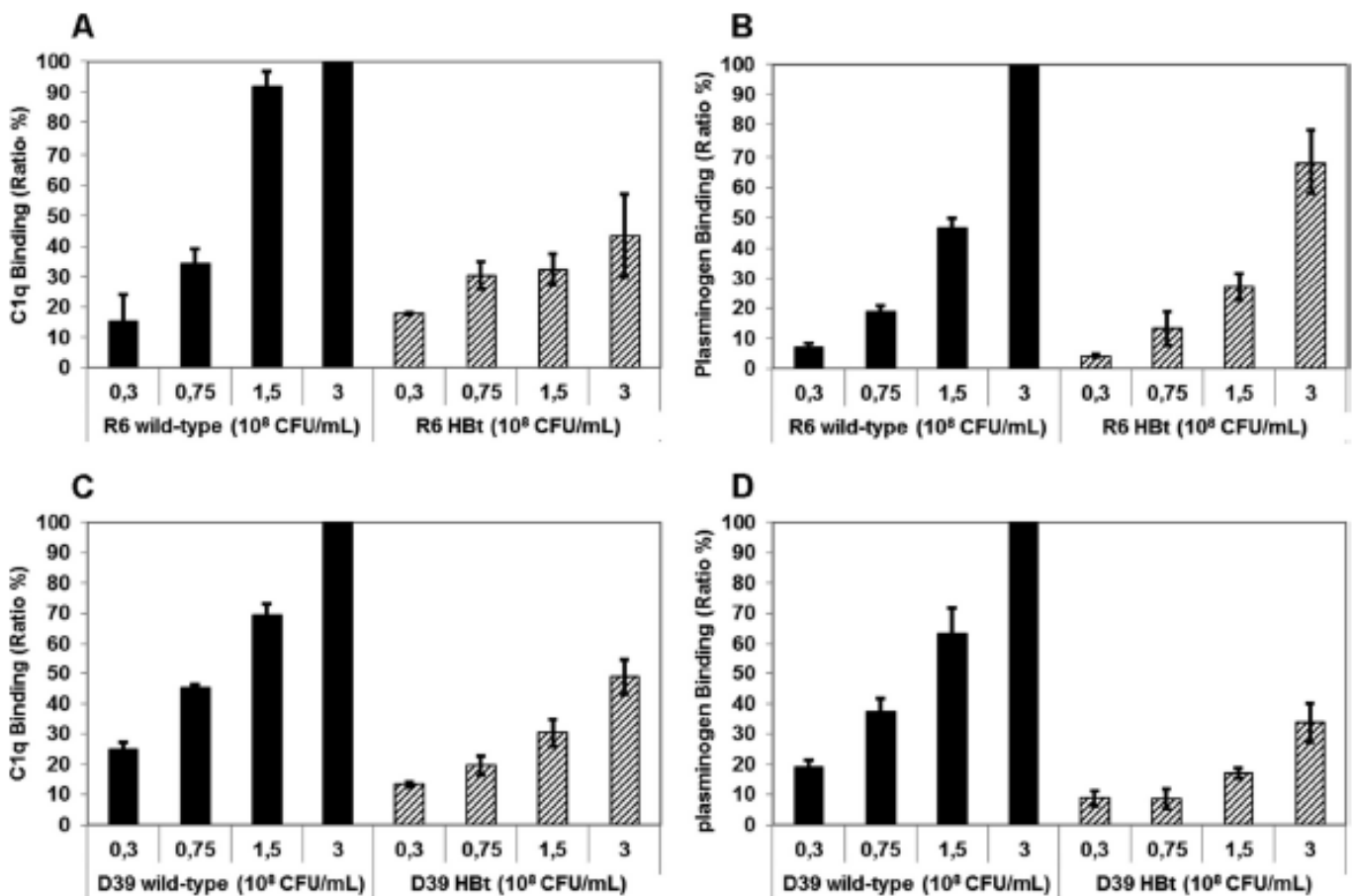


FIGURE 7. Binding of pneumococcal R6 and D39 strains on C1q and plasminogen. FITC-labeled bacteria at the indicated concentration in CFU/ml were incubated for 1 h at room temperature on $1 \mu\text{g}$ of proteins (C1q, plasminogen, and BSA) coated on a 96-well plate. After five washes, the fluorescence of FITC was measured. All experimental data points were triplicates in each single assay. The average of three independent experiments \pm S.D. is shown. The ratios were calculated with respect to the parental strain maximal value. A, R6 wild-type and HbT mutant strain binding to C1q. B, R6 wild-type and HbT mutant strain binding to plasminogen. C, D39 wild-type and HbT mutant strain binding to C1q. D, D39 wild-type and HbT mutant strain binding to plasminogen. Background corresponding to the binding to BSA is subtracted for all points. Error bars correspond to S.D.

CbpE at the pneumococcal surface (43, 44). Similar data were obtained when comparing the wild-type and mutant D39 strains (Fig. 7, C and D). C1q binding to the D39 HbT mutant used at 3×10^7 , 7.5×10^7 , 1.5×10^8 , and 3×10^8 CFU/ml ranged from 46 to 56% when compared with the binding level of the wild-type strain (Fig. 7C). As observed with the R6 strain, the binding of the D39 HbT strain to plasminogen was decreased from 53 to 72% when compared with the D39 parental strain (Fig. 7D).

Hsa and Spn GAPDHs Affect Complement Activation Differently—To measure a possible effect of GAPDH on the complement cascade, we first assayed the capacity of both human and pneumococcal GAPDHs to modulate C1 activation in an *in vitro* complement activation assay. Spontaneous C1 activation measured in the absence of C1 inhibitor after a 20-min incubation at 37°C was not significantly modified in the presence of Hsa GAPDH (Fig. 8A). In contrast, using the same molar ratio (GAPDH/C1, 7:1), Spn GAPDH induced a significant increase of the C1 activation, reaching up to a 1.3-fold increase compared with the control. This observation prompted us to analyze the effect of the pneumococcal GAPDH in the presence of serum using the pneumococcal R6 and the virulent clinical D39 strains. In this assay, wild-type and HbT (deficient for surface

GAPDH) strains were incubated with normal human serum, and C1q, C3b, and C4b deposition was measured. The C1q, C3b, and C4b deposition level on the R6 mutant strain was decreased by 40% when compared with the wild-type strain (Fig. 8B). The effect was even more marked for the capsulated D39 HbT strain, reaching a 90% decrease in C3b deposition when compared with control. These observations provide clear evidence that Spn GAPDH activates the complement classical pathway.

DISCUSSION

We provide the first evidence that the eukaryotic and bacterial GAPDHs exposed at the cells surface are ligands of C1q, a major recognition molecule of the complement system. This conclusion is based on the following concordant observations. 1) The membrane-anchored GAPDH on HeLa cells bound C1q through its GRs. 2) C1qGR and GAPDH co-localized at the surface of apoptotic cells. 3) Cell surface GAPDH exposure increased rapidly at early steps of apoptosis. 4) The pneumococcal and the human GAPDH proteins interacted *in vitro* avidly with C1q through its GR. 5) Pneumococcal strains deficient for GAPDH surface exposure displayed significantly

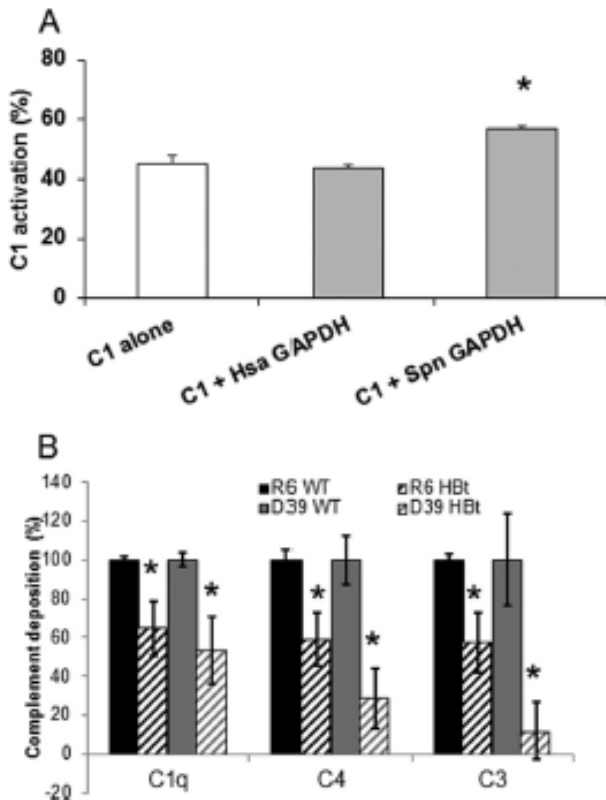


FIGURE 8. Effect of GAPDH on complement activation. *A*, *in vitro* activation of the C1 complex (0.25 μ M) in the presence of human or pneumococcal GAPDHs. C1 activation was monitored by Western blot analysis as described under "Experimental Procedures." *B*, C1q, C3b, and C4b deposition measured in the presence of normal human serum using anti-C1q, anti-C3, and anti-C4 antibodies on wild-type R6 and D39, R6 HBT, and D39 HBT strains (partially deficient for surface GAPDH). Results are expressed relative to the signal obtained with the wild-type R6 or D39 strains, respectively. The data shown represent the mean value \pm S.D. of four (R6) or two (D39) independent experiments. Each experiment was done in triplicate. *, significance was determined by one-way analysis of variance; probability, $p \leq 0.05$. Error bars correspond to S.D.

decreased C1q binding. 6) Pneumococcal GAPDH participated in complement activation unlike human GAPDH.

The complement system provides a first line of immune defense and plays multiple and central roles such as recognition and elimination of foreign invaders as well as damaged self-cells, clearance of immune complexes, connection between innate and adaptive immunity, and interaction with other host cascade systems like the coagulation system. The classical complement pathway is triggered by C1q recognition of IgG- and IgM-targeting microbes or cells to eliminate, microbial or eukaryotic surface moieties (LPS, phosphatidylserine, and polysaccharides), and the pentraxins C-reactive protein, PTX3, and serum amyloid P bound to targets (45). Interestingly, besides its role in activation of the complement cascade, C1q acts as a bridging molecule between apoptotic cell and antigen-presenting cell-like macrophages and dendritic cells, and furthermore, C1q influences the phagocyte immune status (8, 9). Although C1q is described as a pattern recognition molecule with the unique ability to sense an amazing variety of targets, very few proteins expressed at the surface of pathogens have been identified as C1q ligands. To our knowledge, the only reported bac-

terial protein ligand of the globular domains of C1q is the OmpK36 porin of *Klebsiella pneumoniae* (45).

In *S. pneumoniae* immunity, the complement classical pathway is an important component of the response (17, 18) and is activated by various innate immune mediators, including antibodies, C-reactive protein, serum amyloid P, and SIGN-R1. Recently, the lectin pathway has also been reported as a critical part of the innate immune response to pneumococcal infection (20). Many interactions between *S. pneumoniae* proteins and complement molecules have been identified but are likely involved in complement system evasion because mainly complement regulators are recruited by the bacteria. PspC interacts with the complement inhibitor C4b-binding protein, which interferes with the assembly of the C4bC2a C3 convertase; acquisition of C4b-binding protein by the pneumococcus thereby inhibits classical pathway activation (46). CbpA recruits the host regulator Factor H, leading to immune protection and complement inhibition through the formation of a protective shield (47), and also binds to the C3 component of complement (48). The fact that human GAPDH might be involved in the apoptotic cell recognition by C1q raises the possibility of a novel bacterial subversion mechanism of the host immune system by exploiting tolerance.

Until the mid-1990s, it was thought that a protein translated from one gene displayed a unique function. Later on, a growing number of proteins were described to harbor several functions, leading to the generic term of moonlighting proteins (49, 50). This feature is encountered in eukaryotic and prokaryotic organisms and concerns highly conserved proteins involved in metabolic pathways or acting as molecular chaperones. In addition to multiple functions, multiple cellular localizations, including surface exposition (although the secretion mechanism remains unknown), are associated with the moonlighting proteins (51). Most of the bacterial enzymes involved in the glycolytic pathway exert various roles in pathological processes like adhesion and invasion of host cells (32, 51). GAPDH is among the most frequent glycolytic/moonlighting protein associated with the cell surface of pathogenic microorganisms (51) and has been extensively studied for its property to bind to plasminogen (33, 51–54).

Roles of GAPDH in bacterial immunity have also been reported. Group A *Streptococcus*-exposed GAPDH recruits complement C5a, which further inhibits the recruitment of neutrophils and H₂O₂ production, suggesting a role in immune system evasion (55). *Streptococcus agalactiae* GAPDH elicits B cell responses and induces production of the immunosuppressive cytokine IL-10, indicating that GAPDH modulates the immune response to promote host colonization by Group B *Streptococcus* (30). These data suggest that the role of GAPDH when exposed at the surface of bacterial pathogens might favor infection and/or persistence of the pathogen in the host organism by counteracting immune defense mechanisms.

The comprehensive role of externalized GAPDH on eukaryotic cells and in particular on apoptotic cell surfaces is still misunderstood. In this study, we showed an increased level of membrane-associated and surface-exposed GAPDH as soon as 2 h after apoptosis induction (Fig. 1, *A* and *D*). GAPDH was also recovered from cell culture medium of viable cells and to a

GAPDH Is a Novel C1q Ligand

larger extent after the induction of apoptosis (data not shown). These data are supported by a study indicating that glycolytic enzymes such as GAPDH, enolase, and triose-phosphate isomerase are early biomarkers of apoptosis (56). Consequently, the GAPDH recognition by C1q at the early steps of apoptosis could be linked to the uptake of altered self-cells by phagocytes. An interesting aspect highlighted by this work concerns differential effects of human and pneumococcal GAPDHs on complement activation. Bacterial GAPDH activates the complement cascade through the classical pathway. However, the involvement of the lectin and/or the alternative pathways cannot be excluded at this stage. These data indicate that GAPDH is one of the bacterial ligands that lead to complement activation and to the clearance of bacteria. These observations are not consistent with previous reported roles of GAPDH in virulence processes and persistence of the bacteria in the host. This apparent paradox might be scrutinized in light of potential mimicry of apoptotic cells considering that the surface-exposed and/or soluble GAPDH recognition by C1q could be a strategy displayed by the pneumococcus to evade the immune system in some specific step of infection progression.

Acknowledgments—We thank Isabelle Bally, Luca Signor, and Izabel Bérard and Françoise Lacroix and Jean-Philippe Kleman from the Institut de Biologie Structurale platform of the Partnership for Structural Biology and the Institut de Biologie Structurale in Grenoble for assistance and access to the BIAcore, mass spectrometry, and epifluorescence microscope facilities, respectively. We thank Sarah Ancelet for purification of C1q and its GR. We are grateful to Gérard Arlaud for support at the beginning of this work.

REFERENCES

1. Biró, A., Thielens, N. M., Cervenák, L., Prohászka, Z., Füst, G., and Arlaud, G. J. (2007) Modified low density lipoproteins differentially bind and activate the C1 complex of complement. *Mol. Immunol.* **44**, 1169–1177
2. Biro, A., Ling, W. L., and Arlaud, G. J. (2010) Complement protein C1q recognizes enzymatically modified low-density lipoprotein through unesterified fatty acids generated by cholesterol esterase. *Biochemistry* **49**, 2167–2176
3. Blanquet-Grossard, F., Thielens, N. M., Vendrely, C., Jamín, M., and Arlaud, G. J. (2005) Complement protein C1q recognizes a conformationally modified form of the prion protein. *Biochemistry* **44**, 4349–4356
4. Klein, M. A., Kaeser, P. S., Schwarz, P., Weyd, H., Xenarios, I., Zinkernagel, R. M., Carroll, M. C., Verbeek, J. S., Botto, M., Walport, M. J., Molina, H., Kalinke, U., Acha-Orbea, H., and Aguzzi, A. (2001) Complement facilitates early prion pathogenesis. *Nat. Med.* **7**, 488–492
5. Korb, L. C., and Ahearn, J. M. (1997) C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited. *J. Immunol.* **158**, 4525–4528
6. Navratil, J. S., Watkins, S. C., Wisneski, J. J., and Ahearn, J. M. (2001) The globular heads of C1q specifically recognize surface blebs of apoptotic vascular endothelial cells. *J. Immunol.* **166**, 3231–3239
7. Fraser, D. A., Pisalyaput, K., and Tenner, A. J. (2010) C1q enhances microglial clearance of apoptotic neurons and neuronal blebs, and modulates subsequent inflammatory cytokine production. *J. Neurochem.* **112**, 733–743
8. Fraser, D. A., Laust, A. K., Nelson, E. L., and Tenner, A. J. (2009) C1q differentially modulates phagocytosis and cytokine responses during ingestion of apoptotic cells by human monocytes, macrophages, and dendritic cells. *J. Immunol.* **183**, 6175–6185
9. Castellano, G., Woltman, A. M., Schlagwein, N., Xu, W., Schena, F. P., Daha, M. R., and van Kooten, C. (2007) Immune modulation of human dendritic cells by complement. *Eur. J. Immunol.* **37**, 2803–2811
10. Paidassi, H., Tacnet-Delorme, P., Lunardi, T., Arlaud, G. J., Thielens, N. M., and Frchet, P. (2008) The lectin-like activity of human C1q and its implication in DNA and apoptotic cell recognition. *FEBS Lett.* **582**, 3111–3116
11. Paidassi, H., Tacnet-Delorme, P., Garlatti, V., Darnault, C., Ghebrehwet, B., Gaboriaud, C., Arlaud, G. J., and Frchet, P. (2008) C1q binds phosphatidylserine and likely acts as a multiligand-bridging molecule in apoptotic cell recognition. *J. Immunol.* **180**, 2329–2338
12. Paidassi, H., Tacnet-Delorme, P., Garlatti, V., Darnault, C., Ghebrehwet, B., Gaboriaud, C., Arlaud, G. J., and Frchet, P. (2007) C1q binds phosphatidylserine and likely acts as an early bridging molecule in apoptotic cell recognition and clearance. *Mol. Immunol.* **44**, 178 (abstr.)
13. Elward, K., Griffiths, M., Mizuno, M., Harris, C. L., Neal, J. W., Morgan, B. P., and Gasque, P. (2005) CD46 plays a key role in tailoring innate immune recognition of apoptotic and necrotic cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 36342–36354
14. Paidassi, H., Tacnet-Delorme, P., Verneret, M., Gaboriaud, C., Houen, G., Duus, K., Ling, W. L., Arlaud, G. J., and Frchet, P. (2011) Investigations on the C1q-calreticulin-phosphatidylserine interactions yield new insights into apoptotic cell recognition. *J. Mol. Biol.* **408**, 277–290
15. Martin, M., Leffler, J., and Blom, A. M. (2012) Annexin A2 and A5 serve as new ligands for C1Q on apoptotic cells. *J. Biol. Chem.* **287**, 33733–33744
16. O'Brien, K. L., Wolfson, L. J., Watt, J. P., Henkle, E., Deloria-Knoll, M., McCall, N., Lee, E., Mulholland, K., Levine, O. S., and Chertan, T. (2009) Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet* **374**, 893–902
17. Yuste, J., Botto, M., Bottoms, S. E., and Brown, J. S. (2007) Serum amyloid P aids complement-mediated immunity to *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathog.* **3**, 1208–1219
18. Brown, J. S., Hussell, T., Gilliland, S. M., Holden, D. W., Paton, J. C., Ehrenstein, M. R., Walport, M. J., and Botto, M. (2002) The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 16969–16974
19. Yuste, J., Sen, A., Truedsson, L., Jonsson, G., Tay, L. S., Hyams, C., Baxendale, H. E., Goldblatt, F., Botto, M., and Brown, J. S. (2008) Impaired opsonization with C3b and phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae* in sera from subjects with defects in the classical complement pathway. *Infect. Immun.* **76**, 3761–3770
20. Ali, Y. M., Lynch, N. J., Haleem, K. S., Fujita, T., Endo, Y., Hansen, S., Holmskov, U., Takahashi, K., Stahl, G. L., Dudley, T., Girtja, U. V., Wallis, R., Kadioglu, A., Stover, C. M., Andrew, P. W., and Schwaebler, W. J. (2012) The lectin pathway of complement activation is a critical component of the innate immune response to pneumococcal infection. *PLoS Pathog.* **8**, e1002793
21. Kang, Y. S., Do, Y., Lee, H. K., Park, S. H., Cheong, C., Lynch, R. M., Loeffler, J. M., Steinman, R. M., and Park, C. G. (2006) A dominant complement fixation pathway for pneumococcal polysaccharides initiated by SIGN-R1 interacting with C1q. *Cell* **125**, 47–58
22. Sawa, A., Khan, A. A., Hester, L. D., and Snyder, S. H. (1997) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: nuclear translocation participates in neuronal and nonneuronal cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 11669–11674
23. Strover, M. A. (1997) Role of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in normal cell function and in cell pathology. *J. Cell Biochem.* **66**, 133–140
24. Laschet, J. J., Mintier, F., Kurcewicz, I., Bureau, M. H., Trottier, S., Jeaneteau, F., Griffon, N., Samyn, B., Van Beeumen, J., Louvel, J., Sokoloff, P., and Pumain, R. (2004) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a GABAA receptor kinase linking glycolysis to neuronal inhibition. *J. Neurosci.* **24**, 7614–7622
25. Tarze, A., Dentaud, A., Le Bras, M., Maillier, E., Molle, D., Larochette, N., Zamzami, N., Jan, G., Kroemer, G., and Brenner, C. (2007) GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization. *Oncogene* **26**, 2606–2620
26. Raje, C. I., Kumar, S., Harle, A., Nanda, J. S., and Raje, M. (2007) The macrophage cell surface glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a

- novel transferrin receptor. *J. Biol. Chem.* **282**, 3252–3261
27. Pancholi, V. (2001) Multifunctional α -enolase: its role in diseases. *Cell Mol. Life Sci.* **58**, 902–920
 28. Pancholi, V., and Chhatwal, G. S. (2003) Housekeeping enzymes as virulence factors for pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* **293**, 391–401
 29. Matta, S. K., Agarwal, S., and Bhatnagar, R. (2010) Surface localized and extracellular glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Bacillus anthracis* is a plasminogen binding protein. *Biochim. Biophys. Acta* **1804**, 2111–2120
 30. Madureira, P., Baptista, M., Vieira, M., Magalhães, V., Camelo, A., Oliveira, L., Ribeiro, A., Tavares, D., Trieu-Cuot, P., Vilanova, M., and Ferreira, P. (2007) *Streptococcus agalactiae* GAPDH is a virulence-associated immunomodulatory protein. *J. Immunol.* **178**, 1379–1387
 31. Jin, H., Agarwal, S., Agarwal, S., and Pancholi, V. (2011) Surface export of GAPDH/SDH, a glycolytic enzyme, is essential for *Streptococcus pyogenes* virulence. *MBio* **2**, e00068-11
 32. Henderson, B., and Martin, A. (2011) Bacterial virulence in the moonlight: multitasking bacterial moonlighting proteins are virulence determinants in infectious disease. *Infect. Immun.* **79**, 3476–3491
 33. Bergmann, S., Rohde, M., and Hammerschmidt, S. (2004) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus pneumoniae* is a surface-displayed plasminogen-binding protein. *Infect. Immun.* **72**, 2416–2419
 34. Attali, C., Durmort, C., Vernet, T., and Di Guilmi, A. M. (2008) The interaction of *Streptococcus pneumoniae* with plasmin mediates transmigration across endothelial and epithelial monolayers by intercellular junction cleavage. *Infect. Immun.* **76**, 5350–5356
 35. Bergmann, S., Rohde, M., Preissner, K. T., and Hammerschmidt, S. (2005) The nine residue plasminogen-binding motif of the pneumococcal enolase is the major cofactor of plasmin-mediated degradation of extracellular matrix, dissolution of fibrin and transmigration. *Thromb. Haemost.* **94**, 304–311
 36. Tacnet-Delorme, P., Chevallier, S., and Arlaud, G. J. (2001) β -Amyloid fibrils activate the C1 complex of complement under physiological conditions: evidence for a binding site for A β on the C1q globular regions. *J. Immunol.* **167**, 6374–6381
 37. Boël, G., Jin, H., and Pancholi, V. (2005) Inhibition of cell surface export of group A streptococcal anchorless surface dehydrogenase affects bacterial adherence and antiphagocytic properties. *Infect. Immun.* **73**, 6237–6248
 38. Kastner, B., Fischer, N., Golas, M. M., Sander, B., Dube, P., Boehringer, D., Hartmuth, K., Deckert, J., Hauer, F., Wolf, E., Uchtenhagen, H., Urlaub, H., Herzog, F., Peters, J. M., Poerschke, D., Lüthmann, R., and Stark, H. (2008) GraFix: sample preparation for single-particle electron cryomicroscopy. *Nat. Methods* **5**, 53–55
 39. Vellieux, F. M., Hajdu, J., and Hol, W. G. (1995) Refined 3.2 Å structure of glycosomal holo glyceraldehyde phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma brucei brucei*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **51**, 575–589
 40. Ferreira-da-Silva, F., Pereira, P. J., Gales, L., Roessle, M., Svergun, D. I., Moradas-Ferreira, P., and Damas, A. M. (2006) The crystal and solution structures of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase reveal different quaternary structures. *J. Biol. Chem.* **281**, 33433–33440
 41. Jia, B., Linh le, T., Lee, S., Pham, B. P., Liu, J., Pan, H., Zhang, S., and Cheong, G. W. (2011) Biochemical characterization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Thermococcus kodakarensis* KOD1. *Extremophiles* **15**, 337–346
 42. Mouche, F., Gontero, B., Callebaut, I., Mornon, J. P., and Boisset, N. (2002) Striking conformational change suspected within the phosphoribulokinase dimer induced by interaction with GAPDH. *J. Biol. Chem.* **277**, 6743–6749
 43. Bergmann, S., Wild, D., Dtekmann, O., Frank, R., Bracht, D., Chhatwal, G. S., and Hammerschmidt, S. (2003) Identification of a novel plasmin(ogen)-binding motif in surface displayed α -enolase of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **49**, 411–423
 44. Attali, C., Frolet, C., Durmort, C., Offant, J., Vernet, T., and Di Guilmi, A. M. (2008) *Streptococcus pneumoniae* choline-binding protein E interaction with plasminogen/plasmin stimulates migration across the extracellular matrix. *Infect. Immun.* **76**, 466–476
 45. Kojouharova, M., Reid, K., and Gadjeva, M. (2010) New insights into the molecular mechanisms of classical complement activation. *Mol. Immunol.* **47**, 2154–2160
 46. Dieudonné-Vatran, A., Krentz, S., Blom, A. M., Mert, S., Henriques-Normark, B., Riesbeck, K., and Albigier, B. (2009) Clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* bind the complement inhibitor C4b-binding protein in a PspC allele-dependent fashion. *J. Immunol.* **182**, 7865–7877
 47. Lu, L., Ma, Z., Jokiranta, T. S., Whitney, A. R., DeLeo, F. R., and Zhang, J. R. (2008) Species-specific interaction of *Streptococcus pneumoniae* with human complement factor H. *J. Immunol.* **181**, 7138–7146
 48. Smith, B. L., and Hostetter, M. K. (2000) C3 as substrate for adhesion of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* **182**, 497–508
 49. Jeffery, C. J. (2009) Moonlighting proteins—an update. *Mol. Biosyst.* **5**, 345–350
 50. Jeffery, C. J. (1999) Moonlighting proteins. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 8–11
 51. Henderson, B., and Martin, A. (2012) Bacterial moonlighting proteins and bacterial virulence. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, in press
 52. Pancholi, V., and Fischetti, V. A. (1992) A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. *J. Exp. Med.* **176**, 415–426
 53. Egea, L., Aguilera, L., Giménez, R., Sorolla, M. A., Aguilar, J., Badia, J., and Baldoma, I. (2007) Role of secreted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the infection mechanism of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: interaction of the extracellular enzyme with human plasminogen and fibrinogen. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 1190–1203
 54. Jin, H., Song, Y. P., Boel, G., Kocher, J., and Pancholi, V. (2005) Group A streptococcal surface GAPDH, SDH, recognizes uPAR/CD87 as its receptor on the human pharyngeal cell and mediates bacterial adherence to host cells. *J. Mol. Biol.* **350**, 27–41
 55. Terao, Y., Yamaguchi, M., Hamada, S., and Kawabata, S. (2006) Multifunctional glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus pyogenes* is essential for evasion from neutrophils. *J. Biol. Chem.* **281**, 14215–14223
 56. Ucker, D. S., Jain, M. R., Pattabraman, G., Palastewicz, K., Birge, R. B., and Li, H. (2012) Externalized glycolytic enzymes are novel, conserved, and early biomarkers of apoptosis. *J. Biol. Chem.* **287**, 10325–10343

RESUME EN FRANCAIS :

Streptococcus pneumoniae est un pathogène humain majeur causant des pneumonies, méningites et septicémies. Pour assurer sa survie et sa dissémination le pneumocoque déploie un ensemble de facteurs de virulence favorisant l'invasion des tissus et l'évasion du système immunitaire. Une classe particulière de protéines dites « moonlighting », ne sont associées à aucun système d'export connu et pourtant se trouvent localisées en surface du pneumocoque. Les protéines « moonlighting » sont des protéines cytoplasmiques conservées, localisées dans divers compartiments cellulaires et présentant des fonctions additionnelles. La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) est retrouvée en surface de nombreuses cellules et exerce divers rôles dans les processus de virulence d'organismes pathogènes.

La GAPDH de surface du pneumocoque agit comme un facteur de virulence en recrutant le plasminogène / la plasmine de l'hôte, ce qui facilite l'invasion bactérienne à travers la matrice extracellulaire et les barrières endothéliales et épithéliales. Cependant, les mécanismes permettant l'export et la fixation de la GAPDH à la surface de la bactérie n'avaient pas encore été découverts. Ce travail démontre que la GAPDH est relarguée par lyse cellulaire et s'associe au peptidoglycane.

C1q, un composant clé de la voie classique du complément, est un acteur majeur dans la réponse aux infections microbiennes et peut également détecter des éléments nocifs du soi-altéré comme les cellules apoptotiques. L'usage d'approches expérimentales complémentaires a permis d'identifier la GAPDH comme un partenaire de C1q quand elle est exposée en surface de *S. pneumoniae* et de cellules apoptotiques humaines. Néanmoins et de manière plutôt inattendue, seule la GAPDH du pneumocoque active la cascade du complément à la différence de la protéine homologue humaine. Ces résultats encouragent la poursuite d'études afin de comprendre comment la reconnaissance par C1q de deux protéines très proches peut conduire à de telles différences sur ses propriétés d'activation du complément.

TITRE EN ANGLAIS : Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, a glycolytic protein displayed at the cell surface is involved in *Streptococcus pneumoniae* recognition by the complement system

RESUME EN ANGLAIS :

Streptococcus pneumoniae is a major human pathogen, which causes pneumonia, meningitis and septicemia. To insure its survival and dissemination, the pneumococcus deploys an array of virulence factors promoting invasion of tissues and evasion from the immune system. A particular class of proteins not associated with any known export system, the moonlighting proteins, is found at the pneumococcal surface. Moonlighting proteins are conserved cytoplasmic metabolic enzymes or molecular chaperones localized in various cellular compartments and exhibiting additional functions. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is found at the surface of numerous eukaryotic and prokaryotic cells, and display diverse roles in the virulence processes of pathogenic organisms.

The pneumococcal surface GAPDH acts as a virulence factor by binding to host plasminogen/plasmin, which facilitates the bacterial invasion through the extracellular matrix and the endothelial and epithelial cell barriers. However, the mechanisms leading to the GAPDH export and binding to the bacterial surface had not been deciphered yet. This work demonstrates that the GAPDH is released upon cell lysis and associates with the peptidoglycan.

C1q, a key component of the classical complement pathway, is a major player in the response to microbial infection and has been shown to detect noxious altered-self substances such as apoptotic cells. The use of complementary experimental approaches allowed the identification of the GAPDH as a C1q partner when exposed at the surface of *S. pneumoniae* and human apoptotic cells. However, and rather unexpectedly, the pneumococcal GAPDH activates the complement cascade unlike the human one. Those results encourage further studies in order to understand how C1q recognition of two closely related proteins can lead to such striking differences on its complement activation properties.

MOTS CLES / KEY WORDS : *S. pneumoniae*, GAPDH, C1q, système du complément, immunité innée, virulence / *S. pneumoniae*, GAPDH, C1q, complement system, innate immunity, virulence