



DOCTORAT

DE L'UNIVERSITE DE TOULOUSE,
délivré par l'INSA de Toulouse



Spécialité Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries
Filière : Ingénieries Microbienne et Enzymatique

Présentée à
L'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse
par
Julien STORAÏ

Analyse métabolique et transcriptomique de *Streptococcus pneumoniae* en lien avec la production de polysaccharide capsulaire.

Devant le jury composé de :

M. J. DEUTSCHER, Directeur de recherche, CNRS Paris	Rapporteur
M. P. GLASER, Chef de Laboratoire, Institut Pasteur Paris	Rapporteur
M. A. FILLOUX, Professeur, Imperial College Londres	Examineur
M ^{me} M.F. PLANARD, Directeur adj. M-Tech Vrats, Sanofi-Pasteur Lyon	Co-directrice de thèse
M. J.P. CLAVERYYS, Directeur de Recherche, CNRS Toulouse	Président du jury
M. N.D. LINDLEY, Directeur de Recherche, CNRS Toulouse	Directeur de thèse

N° d'ordre : 922

*Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, UMR-CNRS 5504
135 Avenue de Rangueil 31077 Toulouse Cedex*

Nom : STORAI

Prénom : Julien

Titre : Analyse métabolique et transcriptomique de *Streptococcus pneumoniae* en lien avec la production de polysaccharide capsulaire.

Projet de thèse, Spécialité : Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries

Année : 2008

Lieu : Toulouse

N° d'ordre : 922

Pages : 196

Résumé :

Avec pour point de départ une problématique de production vaccinale, une analyse intégrative du métabolisme central et du transcriptome de *S. pneumoniae* en conditions industrielles a permis une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans sa pathogénicité. Ainsi, une corrélation directe entre l'accumulation de plusieurs intermédiaires glycolytiques et l'expression des gènes codant pour la synthèse du polysaccharide capsulaire a pu être établie, et ce dans l'environnement maîtrisé de la culture en fermenteur. De plus, une même corrélation a été confirmée pour les gènes impliqués dans l'assimilation et la modification de la choline, exigence nutritionnelle indispensable pour la croissance et la virulence du pneumocoque. Cette corrélation suggère un contrôle direct ou indirect de l'expression de ces gènes via le régulateur transcriptionnel CcpA (catabolite control protein A), la nature de cette régulation étant encore en cours d'investigation au sein de notre équipe. Les résultats préliminaires semblent cependant indiquer que la mutation de cette protéine provoque une modification significative de l'expression des différents gènes concernés. Au-delà, l'analyse transcriptomique globale couplée à l'étude de séquences consensus révèle que le régulon CcpA de *S. pneumoniae* est extrêmement large. La meilleure compréhension de la physiologie de *S. pneumoniae* a par ailleurs permis d'améliorer de façon satisfaisante la productivité d'un procédé de production vaccinal. Via la mise en place d'une démarche rationnelle utilisant un modèle d'étude, l'ajustement de certains paramètres nutritionnels lors de la culture cellulaire a permis de résoudre la problématique initiale.

Mots Clés :

Streptococcus pneumoniae, vaccin, métabolisme, transcriptome, CcpA, choline, procédé industriel

Abstract :

The kinetic behaviour of *S. pneumoniae* during vaccine production was studied using a dynamic systemic approach. Quantification of key intracellular glycolytic metabolites coupled to global transcriptomic analysis led to an improved knowledge of pneumococcal physiology. In controlled growth conditions, a direct correlation between the accumulation of key glycolytic intermediates and the expression of capsular polysaccharide genes (*cps* operon encoding the main pneumococcal antigen) was established. Interestingly, the same correlation was confirmed for the genes involved in the assimilation and the modification of choline, an indispensable nutritional requirement for both growth and virulence of *S. pneumoniae*. Such a correlation suggests a direct or indirect control of the expression of these genes by the global transcriptional regulator CcpA (catabolite control protein A) since putative *cre* sites upstream of the promoter were identified, even though the exact nature of this regulation remains to be confirmed. Preliminary results indicate that a *ccpA* mutation provokes a significant decrease in the expression of these genes. The global transcriptomic analysis coupled with motif research has revealed an extended CcpA regulon in *S. pneumoniae* including genes involved in diverse metabolic functions. In addition the rational adjustment of key nutritional parameters of the growth medium, based upon the physiological data obtained in this study, led to significant improvements in both polysaccharide yields and quality thereby the improving vaccine production process.

Key words :

Streptococcus pneumoniae, vaccine, metabolism, transcriptome, CcpA, choline, industrial process

Ce travail est le fruit d'une « aventure » de plus de 3 ans, qui n'aurait pas pu voir le jour sans le soutien de nombreuses personnes que je tiens à remercier ici.

Je remercie en premier lieu mes responsables de thèse, Marie-France Planard et Nic Lindley, directeurs respectifs du Département M-Tech Bactériologie de Sanofi-Pasteur et du Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés. Marie-France, merci pour ton amitié, ta disponibilité, ton soutien, et bien sûr pour tout ce que tu m'as appris sur le contexte industriel. Nic, merci pour tout ce que j'ai appris à tes côtés, je n'oublierai pas nos discussions scientifiques, et encore moins la rivalité rugbystique qui nous a animé durant mes années de thèse (qui s'est bien finie pour toi...).

Je tiens à remercier Jean-Pierre Claverys pour m'avoir fait l'honneur d'être le président du jury. J'adresse également mes remerciements à Philippe Glaser et Josef Deutscher d'avoir accepté de juger mes travaux, ainsi qu'à Alain Filloux pour sa participation au jury de thèse.

Je tiens aussi à remercier les membres de l'équipe des lactiques, à savoir Pascal, Valérie, Muriel, Myriam, Sébastien, Sophie et Mathieu. Du côté de Sanofi, je tiens à remercier spécialement l'équipe technique Bactério : Catherine, Corinne, Laurent, Nédal, Rémi, Audrey et Carine, sans oublier tous les autres. Je pense aussi à Régis, René, Fabien et les 2 Marc qui ont toujours été de bons conseils avec moi. Je tiens à adresser un immense merci à Jean-Pierre Claverys et Bernard Martin, du Laboratoire de Microbiologie et de Génétique Moléculaire de Toulouse. Votre soutien scientifique a été inestimable durant ce travail, mais c'est surtout votre simplicité et votre bonne humeur que je n'oublierai pas. J'en profite d'ailleurs pour remercier Chantal Granadel, leur technicienne de laboratoire, pour sa gentillesse et le lourd travail de biologie moléculaire qu'elle a réalisé. Merci également à la plateforme Biopuces, et tout spécialement à Lidwine et Serguei pour leurs précieux conseils.

Je remercie mille fois les secrétaires de Marie-France et de Nic : Chrystelle Aubert-Marin et Nathalie Cuny, qui ont assuré la majeure partie de ma logistique personnelle, ce qui n'était pas chose facile...

Un travail de thèse ne se fait jamais sans des compagnons de route (ou de labo...), merci donc à Cécile, Sébastien, Emma, Laeti, Olivier, Etienne et Clémentine pour votre amitié, et pour nos discussions hautement scientifiques (surtout avec Seb...). Merci aussi à mes collègues de bureau de Sanofi : Talsida, Mathieu, Patrick, et Etienne, pour votre bonne humeur.

Je remercie enfin mes proches : en premier lieu Anne-Claire qui a réussi à supporter son chéri de thésard et à relire ce manuscrit en entier, toute ma famille et particulièrement mes parents (et beaux parents) ainsi que mon frère, mes amis de Toulouse, de Lyon et d'ailleurs, et pour finir la deuxième famille qu'ont été mes colocs de Toulouse Benjamin, Benoit, Jérémie et Zazou.

Abréviations

1,3PG	1,3-diphosphoglycérate
2PG	2-phosphoglycérate
3PG	3-phosphoglycérate
Ac	acide
ACK	acétate kinase
ADHE	alcool déshydrogénase
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AMM	autorisation de mise sur le marché
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomique
ARNt	ARN de transfert
ATP	adénosine triphosphate
BCAA	branched chain amino acids
CbpA	choline binding protein A
CBPs	choline binding proteins
CcpA	catabolite control protein A
CPS	polysaccharide capsulaire
<i>cre</i>	catabolite responsive element
CSP	competence stimulating peptide
Ct	cycle threshold
CTP	cytosine triphosphate
DHAP	dihydroxyacétone-phosphate
DO	densité optique
ENO	énolase
F6P	fructose-6-phosphate
FDA	fructose-1,6-diphosphate aldolase
FDP	fructose-1,6-diphosphate
FucNac	N-acétyl fucosamine
G1P	glucose-1-phosphate
G6P	glucose-6-phosphate
G6PDH	G6P déshydrogénase
Gal1P	galactose-1-phosphate
Gal6P	galactose-6-phosphate
GalK	galactokinase
GalNac	N-acétyl galactosamine
GAP	glycéraldéhyde-3-phosphate
GAPDH	glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase
GDH	glycerophosphate déshydrogénase
Glc	glucose
GlcA	Acide glucuronique
GlcK	glucokinase
GlcNac	N-acétyl glucosamine
GTP	guanosine triphosphate
HF	acide hydrofluorhydrique
hk	histidine kinase
HPAEC	high performance anion exchange chromatography
HPLC	high performance liquid chromatography
HPr	Histidine phosphoprotein

HPSEC	high performance size exclusion chromatography
kb	kilo base
KD	coefficient de partition
kD	kilo Dalton
LDH	lactate déshydrogénase
LMGM	Laboratoire de Microbiologie et de Génétique Moléculaire
LTA	acide lipoteichoïque
ManNac	N-acétyl mannosamine
MSP	milieu Sanofi-Pasteur
NAD(P)H	nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) réduit
NAD+	nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) oxydé
NADH	nicotinamide adénine dinucléotide réduit
P-βgal	phospho-beta-galactosidase
PAD	pulsed amperometry detection
PAFr	platelet activating factor receptor
pb	paires de bases
PCR	polymerase chain reaction
PCV	pneumococcal conjugated vaccine
PDH	pyruvate déshydrogénase
PEP	phosphoenolpyruvate
PEP	phosphoenolpyruvate
PFK	phosphofructokinase
PFL	pyruvate formiate lyase
PGI	glucose-6-phosphate isomerase
PGK	phosphoglycérate kinase
PGM	phosphoglucomutase
PMG	phosphoglycérate mutase
PMG	phosphoglucomutase
PsaA	pneumococcal surface antigen A
PSM	poste de sécurité microbiologique
PTA	phosphate acétyl transferase
PTS	phosphotransférase system
PYK	pyruvate kinase
RBS	ribosome binding site
RLU	relative luminescence unit
rpm	tours par minute
rr	response regulator
RT-PCR	real time PCR
TA	acide teichoïque
Tag6P	tagatose-6-phosphate
TCS	two component system
TDA	tagatose-1,6-diphosphate aldolase
TDP	tagatose-1,6-diphosphate
TFA	acide trifluoroacétique
TIGR	The Institute for Genomic Research
Tm	température de fusion
TPI	triose-phosphate isomérase
TTP	thymidine triphosphate
UDP	Uridine di-phosphate
UMP	Uridine mono-phosphate
UTP	Uridine tri-phosphate
Wt	wild type (souche sauvage)

Sommaire

Chapitre I : Introduction bibliographique 15

I. <i>Streptococcus pneumoniae</i> : deuxième cause de mortalité d'origine bactérienne dans le monde.....	17
I.1 Données épidémiologiques	17
I.2 Prophylaxie	18
I.2.1 Vaccination	18
I.2.2 Antibiotiques et résistances.....	19
I.3 Le vaccin Pneumo 23 : aspects économiques	20
II. <i>S. pneumoniae</i> : une bactérie lactique pathogène	22
II.1 Caractéristiques générales	22
II.2 Dynamique de colonisation et processus d'infection	23
II.3 Potentialités métaboliques de <i>S. pneumoniae</i>	24
II.3.1 Métabolisme carboné de <i>S. pneumoniae</i>	25
II.3.1.1 Le transport des sucres	25
II.3.1.2 Le catabolisme des sucres.....	27
II.3.1.3 Régulation du catabolisme des sucres	29
II.3.1.4 Tolérance vis-à-vis de l'oxygène.....	31
II.3.2 Métabolisme azoté de <i>S. pneumoniae</i>	31
II.4 Les gènes du métabolisme central et leurs régulations.....	32
II.4.1 Les gènes du métabolisme carboné	33
II.4.2 Régulation des gènes du métabolisme carboné	34
II.4.3 Les gènes du métabolisme azoté	38
II.4.4 Régulation des gènes du métabolisme azoté	40
III. Les différents facteurs de pathogénicité de <i>S. pneumoniae</i>	42
III.1 Le polysaccharide capsulaire : déterminant antigénique majeur.....	42
III.1.1 Structures et fonctions du polysaccharide capsulaire.....	43
III.1.2 Le mécanisme de synthèse du polysaccharide capsulaire.....	45
III.1.3 Aspects génétiques de la synthèse du polysaccharide capsulaire	46
III.1.3.1 Les différents types d'opérons capsulaires de <i>S. pneumoniae</i>	47
III.1.3.2 L'évolution sérotypique	48
III.1.4 Les mécanismes de régulation de la synthèse capsulaire.....	49
III.2 La choline : exigence nutritionnelle et rôle dans la pathogénicité	51
III.2.1 Choline et acides teichoïques	52
III.2.2 Choline, croissance et virulence.....	52

III.2.3 Choline : aspects génétiques	53
III.3 Les autres facteurs de pathogénicité de <i>S. pneumoniae</i>	54
III.3.1 Les enzymes lytiques	55
III.3.2 Les protéines impliquées dans l'adhésion.....	58
III.3.3 Autres protéines d'intérêt.....	60
IV. Le mécanisme de variation de phase.....	61
V. Conclusion.....	63
VI. Problématique du sujet et objectifs de mon travail de thèse	64
VI.1 Problématique	64
VI.2 Objectifs et plan de mon travail de thèse	65
VI.2.1 Aspect fondamental : compréhension du déterminisme de synthèse capsulaire de <i>S. pneumoniae</i>	65
VI.2.2 Aspect industriel : amélioration des potentialités de production au niveau fermentaire pour le procédé Pneumo 23	66
Chapitre II : Matériel et Méthodes	61
I. Souches	70
II. Cultures.....	71
II.1 Milieux de culture.....	71
II.1.1 Composition.....	71
II.1.2 Préparation des milieux	71
II.1.2.1 Milieu pneumo Sanofi-Pasteur	71
II.1.2.2 Milieu M17	72
II.2 Techniques de culture.....	72
II.2.1 Conservation des souches.....	72
II.2.2 Culture des souches pathogènes	73
II.2.2.1 Environnement de travail.....	73
II.2.2.2 Précultures	73
II.2.2.3 Culture en fermenteur.....	74
II.2.3 Culture de la souche non pathogène R6	75
II.2.3.1 Précultures	75
II.2.3.2 Culture en fermenteur.....	75
III. Techniques analytiques exocellulaires	76
III.1 Mesure de la concentration en biomasse.....	76
III.1.1 Turbidimétrie.....	76
III.1.2 Gravimétrie.....	76
III.2 Dosage des substrats et produits de fermentation	76

III.3 Dosage du polysaccharide capsulaire.....	77
III.3.1 Prise d'échantillons en culture	77
III.3.2 Dialyse des échantillons	78
III.3.3 Hydrolyse des échantillons et de la gamme étalon	78
III.3.3.1 Sérotypes 4, 8, 20 et 33F	78
III.3.3.2 Sérotype 5.....	79
III.3.4 HPAEC-PAD	79
III.3.5 Calcul de la concentration en polysaccharide capsulaire (CPS)	81
III.4 Dosage des acides teichoïques ou polyoside C	81
III.4.1 Hydrolyse des échantillons et de la gamme étalon	81
III.4.2 HPAEC-PAD	82
III.4.3 Calcul de la concentration en acides teichoïques	82
III.5 Analyse de la taille du polysaccharide capsulaire	83
III.5.1 HPSEC	83
III.5.2 Détermination de la taille du polysaccharide capsulaire.....	83
IV. Dosage des métabolites intracellulaires	85
IV.1 Prélèvements et extractions.....	85
IV.2 Purification des métabolites intracellulaires	85
IV.3 Dosage des métabolites intracellulaires	86
IV.3.1 Dosage du G6P, du F6P et du G1P	86
IV.3.2 Dosage du FDP, du GAP et du DHAP.....	87
IV.3.3 Dosage du PEP et du pyruvate (pyruvate non récupéré sur colonne).....	87
IV.3.4 Calcul des concentrations intracellulaires des métabolites.....	88
V. Analyse de l'expression des gènes	90
V.1 Extraction et quantification de l'ARN total	90
V.2 Analyse globale de l'expression des gènes par puces à ADN (microarrays).....	91
V.2.1 Lames Eurogentec <i>S. pneumoniae</i> TIGR 4	91
V.2.2 Préparation des ADNc.....	92
V.2.3 Préhybridation, hybridation et détection	93
V.2.4 Plan d'expérience	93
V.2.5 Traitement des données	93
V.3 Analyse de l'expression des gènes par RT-PCR quantitative.....	94
V.3.1 Préparation des ADNc.....	94
V.3.2 Design des primers	95
V.3.3 PCR en temps réel	95

V.3.4 Quantification des niveaux d'expression	95
VI. Clonage et expression <i>in vivo</i>	97
VI.1 Extraction de l'ADN génomique	97
VI.2 PCR.....	97
VI.3 Vecteurs	98
VI.4 Mutagenèse du site <i>cre</i> et mutation du gène <i>ccpA</i>	98
VI.5 Transformation.....	99
VI.6 Analyse de l'expression <i>in vivo</i>	99
VII. Outils statistiques et bioinformatiques.....	100
VIII. La production de polysaccharide capsulaire de <i>S. pneumoniae</i> chez Sanofi-Pasteur	101
VIII.1 Principe général.....	101
VIII.2 Culture des cellules	101
VIII.3 Récolte.....	103
VIII.4 Purification	104
Chapitre III: Résultats et Discussion	105
I. Compréhension du comportement physiologique de <i>S. pneumoniae</i> en conditions de culture industrielle.....	107
I.1 Stratégie expérimentale.....	107
I.2 Principaux résultats et discussion	108
I.2.1 Analyse macrocinétique : le métabolisme carboné et la productivité capsulaire sont souches-spécifiques	108
I.2.2 Analyse du métabolisme central : accumulation différentielle d'intermédiaires glycolytiques clé.....	109
I.2.3 Analyse de l'expression des gènes : corrélation entre activité métabolique et transcription de gènes d'intérêt	112
I.2.4 Analyse bioinformatique en lien avec l'hypothèse d'une régulation CcpA-FDP dépendante.....	115
I.2.5 Expérimentations en cours pour la validation de notre hypothèse	119
I.2.5.1 Stratégie expérimentale.....	120
I.2.5.2 Impact de CcpA sur la transcription de l'opéron <i>licI</i>	121
I.2.5.3 Impact de CcpA sur la transcription de l'opéron <i>cps</i>	123
I.2.5.4 Bilan des travaux en cours et nouvelles stratégies.....	126
I.3 Conclusion sur les résultats.....	127
II. Application industrielle : amélioration de la productivité en polysaccharide capsulaire	128

II.1 Stratégie expérimentale	128
II.2 Evaluation du comportement macrocinétique de 5 sérotypes en conditions industrielles standards	129
II.2.1 Analyse macrocinétique	129
II.2.2 Interprétation	131
II.2.3 Conclusion	133
II.3 Amélioration de la productivité capsulaire : ajustement des paramètres nutritionnels	133
II.3.1 Les contraintes réglementaires	133
II.3.2 Les cibles d'amélioration	134
II.3.3 Augmentation de la concentration en glucose	135
II.3.4 Augmentation de la concentration en choline parallèlement à la concentration en glucose	136
II.3.4.1 Analyse macrocinétique	137
II.3.4.2 Interprétation	139
II.3.4.3 Conclusion	140
II.4 Essais à l'échelle industrielle au sein du bâtiment de production	141
II.4.1 Contexte et mise en place	141
II.4.2 Principaux résultats	142
II.4.2.1 Culture cellulaire	142
II.4.2.2 Récolte	144
II.4.2.3 Purification	144
II.4.3 Conclusion sur les essais à l'échelle industrielle	145
Chapitre IV : Conclusion et Perspectives	147
Références Bibliographiques	157
Publications et communications	177
Annexes	181

Chapitre I : Introduction bibliographique

I. *Streptococcus pneumoniae* : deuxième cause de mortalité d'origine bactérienne dans le monde.

I.1 Données épidémiologiques

Streptococcus pneumoniae constitue à ce jour la deuxième cause de mortalité d'origine bactérienne dans le monde après la tuberculose, selon l'organisation mondiale de la santé (www.who.int/en/). On estime plus précisément qu'environ 1,2 million d'enfants de moins de 5 ans meurent chaque année d'une conséquence des infections à pneumocoques, en particulier dans les pays en voie de développement. Cette bactérie est majoritairement responsable de syndromes invasifs de type méningites ou pneumonies, ou moins sévères comme les sinusites et les otites moyennes aiguës (Hausdorff *et al.*, 2005).

Colonisateur classique des voies respiratoires de l'homme avec en particulier le nasopharynx, tout enfant devient virtuellement porteur de la bactérie durant la première année de vie. Pour les pays en voie de développement, le risque de développer un syndrome invasif est extrêmement élevé chez l'enfant, la bactérie constituant la première cause de méningite en Afrique ou d'autres pays du sud. Concernant les pays développés, la plupart des enfants peuvent contracter une ou plusieurs otites moyennes durant leur enfance, et seulement pour un nombre moins important des syndromes plus invasifs. A titre d'exemple, 7 millions de cas d'otites moyennes recensés chaque année aux USA sont attribués à *S. pneumoniae* (Grijalva *et al.*, 2007).

Même si l'enfant est le principal foyer d'infections sévères, les personnes âgées constituent elles aussi une cible privilégiée. De plus, les personnes souffrant de maladies chroniques ou d'immunodéficiences représentent elles aussi des populations à risque. On estime qu'environ 30 % des cas de pneumonies recensés aux USA concernant des personnes de 65 ans ou plus ont pour origine *S. pneumoniae*, avec un risque de mortalité consécutif compris entre 10 et 30 %. Enfin, la bactérie est une cause sous-estimée d'infections nosocomiales notamment dans les services de soins intensifs, ou les services de soins palliatifs (Grijalva *et al.*, 2007).

Table 1. Sérotypes couverts par les vaccins actuels ou en cours de développement.
 D'après Hubben *et al.*, 2007. * vaccins en développement, + PCV : pneumococcal conjugated vaccine.

Pneumo 23 (Sanofi- Pasteur)	Prevnar (Wyeth)	Streptorix* (GSK, 2008)	PCV 9** (Wyeth)	PCV 13** (Wyeth)	
1	4	1	1	1	
2	6B	4	4	3	
3	9V	5	5	4	
4	14	6B	6B	5	
5	18C	7F	9V	6A	
6B	19F	9V	14	6B	
7B	23F	14	18C	7F	
8	Tous ces sérotypes sont conjugués chimiquement à la protéine porteuse CRM197 de <i>Corynebacterium diphtheriae</i> (souche C7)	18C	19F	9V	
9N		19F	23F	14	
9V		23F	Protéine porteuse non communiquée à ce jour	18C	
10A		Tous ces sérotypes sont conjugués chimiquement à une nouvelle protéine porteuse dérivée de <i>Haemophilus influenzae</i> (Breuer, 2007)		19A	
11A				19F	
12F				23F	
14				Protéine porteuse non communiquée à ce jour	Protéine porteuse non communiquée à ce jour
15B					
17F					
18C					
19A					
19F					
20	Protéine porteuse non communiquée à ce jour				
22F					
23F					
33F					

I.2 Prophylaxie

I.2.1 Vaccination

L'existence des vaccins antipneumococciques est étroitement liée à la multiplicité des sérotypes existants, à savoir 90 sérotypes référencés dans la nature en fonction de la composition de leur polysaccharide capsulaire. Le caractère immunogène de la capsule permet d'induire la formation d'anticorps permettant la phagocytose des pneumocoques, cette propriété ayant été mise à profit dans la préparation des vaccins.

Les premiers vaccins antipneumococciques de nature polysaccharidique (tétravalents) ont été disponibles aux USA peu après la seconde guerre mondiale, sans rencontrer pour autant un large succès. En effet, leur apparition a coïncidé avec l'avènement de la pénicilline qui permettait alors de contrôler aisément les infections à pneumocoques. Toutefois, l'importante mortalité résiduelle malgré l'utilisation d'antibiotiques, ainsi que l'émergence progressive de souches résistantes, a conduit à la mise sur le marché d'un 14-valent (14 sérotypes) à la fin des années 70 aux USA, puis en Europe. Ce vaccin a été rapidement remplacé en 1983 par un des deux vaccins actuels, le 23-valent couvrant 90 % des sérotypes impliqués dans des infections invasives aux USA. Il s'agit du vaccin produit par Sanofi-Pasteur sous le nom de Pneumo 23 (un analogue étant commercialisé par Merck sous le nom de Pneumovax 23), recommandé en particulier pour les populations à risque à partir de l'âge de 5 ans. En France, ce vaccin est préconisé dans le cadre du calendrier vaccinal. Toutefois, il n'est pas adapté aux enfants de moins de 2 ans qui présentent un déficit de réponse aux polysides, du fait de l'immaturation de leurs lymphocytes B (Bogaert *et al.*, 2004b).

Dans ce cadre, un nouveau vaccin heptavalent conjugué à une protéine porteuse a fait son apparition en 2000 sous le nom de Prevnar (produit par Wyeth), induisant une réponse immune lymphocyte T-dépendante qui est présente chez l'homme dès la naissance. Ce vaccin est fortement recommandé à partir de l'âge de 2 mois, plus particulièrement pour des enfants présentant des facteurs de risque. Néanmoins, le nombre de polysaccharides capsulaires pouvant être conjugués à la protéine porteuse reste limité, et leurs choix parmi les sérotypes à importance « pédiatrique » n'offre pas la même couverture selon les populations (Hausdorff *et al.*, 2005). La couverture sérotypique des vaccins actuels, ou en cours de développement, est présentée en table 1.

Outre la protection individuelle en résultant, la vaccination limite la dissémination horizontale, en diminuant le nombre de porteurs dans les communautés d'enfants vaccinés. Les sérotypes choisis sont également parmi les plus résistants aux antibiotiques, permettant d'espérer que la proportion de souches résistantes tende à diminuer au cours des prochaines années. Toutefois, la couverture vaccinale étant limitée, les pneumocoques élaborent de nouvelles stratégies d'adaptation environnementale leur permettant de basculer vers de nouveaux sérotypes (Jefferies *et al.*, 2004). Des progrès sont donc attendus avec des vaccins conjugués incluant 9 à 13 sérotypes (Hubben *et al.*, 2007). Par ailleurs, de nouveaux vaccins sont en cours d'élaboration, ciblant en particulier les protéines de surface impliquées dans la colonisation et l'adhésion des pneumocoques (Bogaert *et al.*, 2004a).

I.2.2 Antibiotiques et résistances

Au cours des dernières décennies, des souches de pneumocoques résistantes, voire multirésistantes, à plusieurs classes d'antibiotiques se sont largement diffusées dans la population à l'échelle mondiale (Felmingham *et al.*, 2002). Cette adaptation des pneumocoques aux antibiotiques peut notamment s'expliquer par des transferts horizontaux de gènes, essentiellement dus à la densité et à la diversité bactérienne présentes au niveau des voies respiratoires aériennes. En effet, *S. pneumoniae* est une bactérie décrite comme naturellement compétente, signifiant qu'elle possède une machinerie moléculaire qui lui permet l'intégration dans son génome de fragments d'ADN (généralement homologues) d'origine exogène (Claverys et Havarstein, 2002). Du fait de sa grande plasticité génétique, cette bactérie a donc pu bénéficier de transferts de gènes de résistance provenant d'autres microorganismes cohabitant au sein des voies respiratoires, comme par exemple *Streptococcus oralis* ou *Streptococcus mitis* (Claverys *et al.*, 2000). De plus, il a été récemment démontré que les antibiotiques constituaient des inducteurs directs du mécanisme de compétence, confirmant que la pression de sélection qu'ils exercent contribue aux transferts horizontaux de gènes, et donc à l'émergence de nouvelles résistances (Prudhomme *et al.*, 2006).

Ainsi, le taux de prévalence des pneumocoques à sensibilité diminuée à la pénicilline progresse d'année en année, avec une grande disparité d'un pays à l'autre voire même d'une région à l'autre. En Europe, c'est la France après l'Espagne qui présente le taux le plus élevé

avec près de 40 % des souches isolées chez l'adulte, ce taux s'élevant chez l'enfant à 54 % pour les cas de méningites (Bingen *et al.*, 2005). Toutefois, certaines classes d'antibiotiques présentent encore, de façon presque certaine, une efficacité contre les souches résistantes de pneumocoques. Je citerai à titre d'exemple la classe des glycopeptides (Vancomycine et Teicoplanine), qui n'a cependant pas d'efficacité vis-à-vis d'autres pathogènes comme *Neisseria meningitidis*, les entérocoques ou encore *Staphylococcus aureus*. Certains traitements spécifiques aux infections nosocomiales, comme l'association Quinupristine / Dalfopristine, ciblent plus largement les pathogènes cités précédemment (résistants à la Vancomycine). Enfin, la Telithromycine se révèle particulièrement efficace pour les pathogènes respiratoires Pénicillino-résistants (File, 2003).

I.3 Le vaccin Pneumo 23 : aspects économiques

Après une décroissance observée au cours de la dernière décennie, on observe depuis 2002 une réémergence des infections graves à pneumocoques, selon le réseau de surveillance EPIBAC (www.invs.sante.fr). Dans ce cadre, le marché des vaccins antipneumococciques fait l'objet d'une croissance continue, avec des projections très favorables jusqu'à l'horizon 2012.

En 2006, le marché des vaccins pédiatriques ciblant le pneumocoque représentait environ 1,7 milliards de dollars, avec des projections de croissance annuelle moyenne de 6 % jusqu'en 2012. Cette partie du marché est essentiellement couverte par le vaccin Prevnar, dont le bénéfice net annuel est de l'ordre de 1,5 milliards de dollars, soit le plus fort bénéfice pour un vaccin à l'échelle mondiale. Un tel bénéfice est étroitement lié à l'inscription de ce vaccin au programme vaccinal américain dès 2000. Sur ce secteur pédiatrique, le Pneumo 23 ne représente qu'une faible part de marché, étant donné sa très faible efficacité chez l'enfant de moins de 2 ans (Sahoo, 2007).

Concernant la vaccination chez l'adulte, le marché représente en 2007 environ 500 millions de dollars, pour lequel le vaccin Pneumo 23 couvre une part beaucoup plus significative. De la même manière que le secteur pédiatrique, le secteur adulte affiche une prévision de croissance annuelle de 9 % jusqu'en 2012 (Sahoo, 2007). Le Pneumo 23 a donc perdu une large part du marché des vaccins pneumococciques depuis l'introduction sur le marché du Prevnar. La concurrence dans ce secteur risque encore de s'accroître, avec la sortie prévue en 2008 de Streptorix par GSK (Breuer, 2007), un décavalent conjugué à une

protéine porteuse d'*Haemophilus influenzae*. La commercialisation à moyen terme d'un vaccin conjugué par Sanofi-Pasteur devrait permettre de combler le déficit sur le marché pédiatrique. Toutefois, la reprise de croissance du secteur associée à la large couverture de sérotypes, assure au Pneumo 23 un avenir prometteur dans les années qui viennent, confirmé par la progression constante des ventes de ce vaccin. En effet, malgré une protection efficace du Prevnar vis-à-vis des sérotypes « pédiatriques » qu'il couvre, cette vaccination a tendance à induire une redistribution sérotypique, à savoir le remplacement des sérotypes couverts par de nouveaux sérotypes (Spratt et Greenwood, 2000).

II. *S. pneumoniae* : une bactérie lactique pathogène

II.1 Caractéristiques générales

La famille des bactéries lactiques regroupe 11 genres bactériens dont les plus connus sont *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Streptococcus*. Il s'agit de bactéries Gram+ (à faible contenu en G+C) dont la caractéristique principale est de convertir les sucres en acide lactique. Le genre *Streptococcus* comprend un nombre important d'espèces, les plus connues étant *agalactiae*, *pyogenes* et *pneumoniae* pour les pathogènes, et *thermophilus* pour les bactéries d'intérêt industriel.

Streptococcus pneumoniae usuellement appelée pneumocoque est une bactérie Gram+ (à faible contenu en G+C), anaérobie facultative se présentant sous la forme de coques ovoïdes. Classiquement, on trouve ces bactéries groupées par 2 (expliquant leur précédente dénomination *Diplococcus pneumoniae* dans la classification), certaines conditions pouvant favoriser la formation de longues chaînettes (figures 1 et 2). *S. pneumoniae* est une bactérie capsulée, catalase négative, non sporulante, naturellement compétente, présentant une sensibilité à l'optochine et lysée en présence de sels biliaires. La température optimale de croissance se situe autour de 37°C, avec un pH optimal de 7,2. 90 sérotypes sont référencés dans la nature, en fonction de la composition du polysaccharide capsulaire. Historiquement, cette bactérie est à l'origine de la découverte du principe transformant par Frederick Griffith en 1929, dont la nature biochimique (ADN) fut seulement mise en évidence en 1944 par les travaux d'Avery (Friedrich Miescher avait déjà identifié une substance riche en phosphate, la nucléine, à l'intérieur du noyau des cellules à la fin du 19^{ème} siècle).

Le génome de la première souche pathogène séquencée (Tettelin *et al.*, 2001) est constitué d'un chromosome circulaire de 2,16 Mb, possédant un % GC moyen de 39,7 % et 83 % de régions codantes. Sur les 2303 gènes identifiés, 2105 codent pour des protéines dont 64 % ont une fonction biologique validée ou attribuée par homologie (1440 gènes), 16 % une fonction inconnue, et 20 % sans aucune homologie avec les banques de données. Un caractère notable est le niveau important d'homologie de *S. pneumoniae* avec *Lactococcus lactis*, à savoir 1219 protéines similaires sur les 1440 ayant une fonction identifiée (Tettelin *et al.*, 2001).

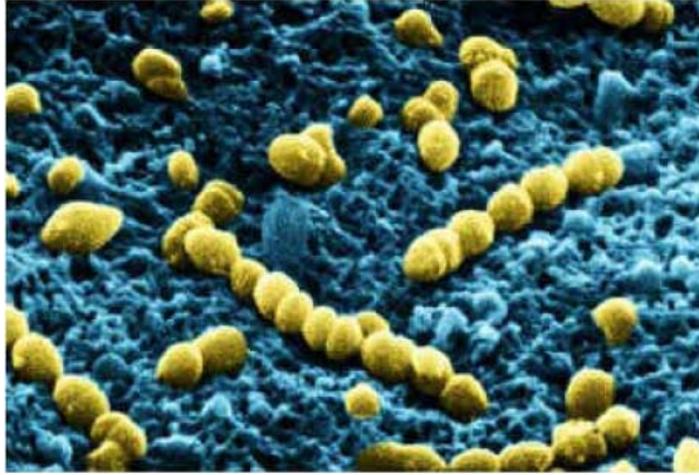


Figure 1. *S. pneumoniae* au microscope électronique

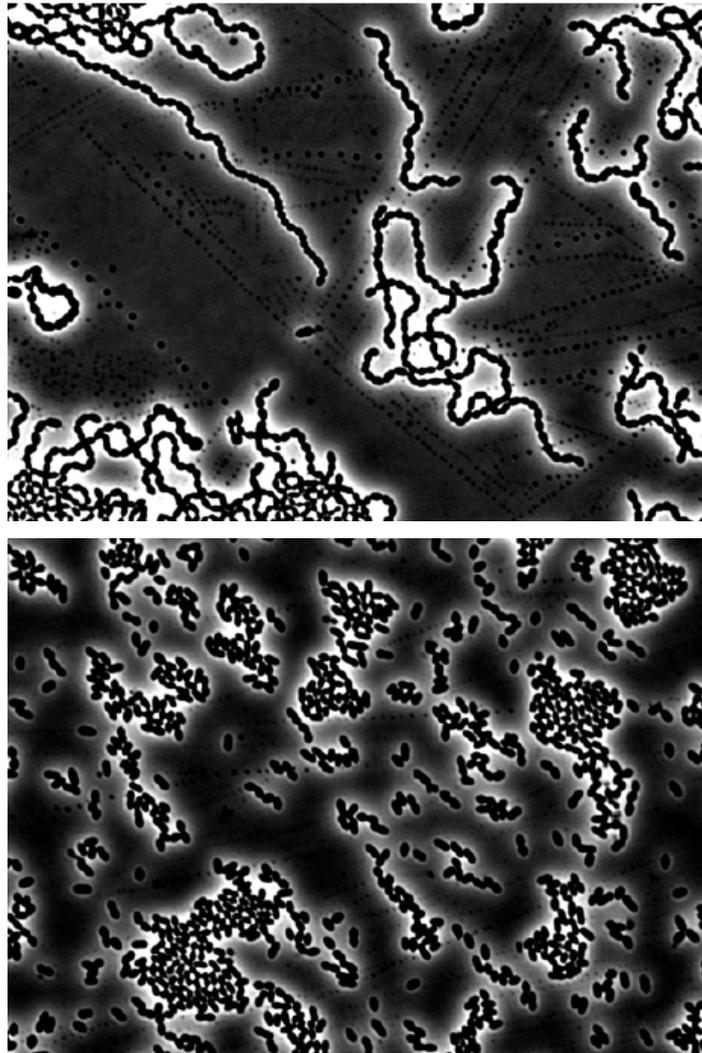


Figure 2. *S. pneumoniae* au microscope optique à contraste de phase.

II.2 Dynamique de colonisation et processus d'infection

L'homme est la seule niche écologique dans laquelle il est possible d'identifier le pneumocoque. Immédiatement après la naissance, l'enfant acquiert rapidement une population bactérienne commensale colonisant la peau et les muqueuses. Les voies aériennes supérieures constituent ainsi un réservoir écologique majeur pour différentes espèces bactériennes, et plus particulièrement au niveau du nasopharynx (Rotimi et Duerden, 1981). Cette zone est en effet densément colonisée par une large variété de bactéries, dont certaines pathogènes opportunistes comme *S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, ou *Neisseria meningitidis*. Il s'agit d'un processus dynamique dans lequel il y a maintien d'un équilibre entre acquisition et élimination de la flore bactérienne (Ghaffar *et al.*, 1999).

Concernant le pneumocoque, la colonisation se limite le plus souvent à un simple portage asymptomatique, essentiellement lié à la capacité d'adhésion aux cellules épithéliales, et mettant en jeu deux principaux facteurs que sont les neuraminidases NanA et NanB, ainsi que l'adhésine de surface PsaA (pneumococcal surface antigen A). Les neuraminidases permettent notamment de diminuer la viscosité du mucus présent sur l'épithélium (Tong *et al.*, 2000), PsaA assurant la liaison avec les résidus carbonés N-acetyl-glucosamine des cellules épithéliales (figure 3). Ce portage permet à la fois une dissémination horizontale dans l'environnement et donc dans la communauté, mais aussi une dissémination au sein des voies respiratoires à l'origine des otites moyennes chez l'enfant, ou encore des pneumopathies chez les sujets à risque (Garcia-Rodriguez et Fresnadillo Martinez, 2002).

Il s'agit quoiqu'il arrive d'une phase indispensable au développement d'une infection (Magee et Yother, 2001).

L'évolution de la colonisation vers un processus infectieux correspond à une transition depuis le système respiratoire vers le sang, provoquant des bactériémies (présence dans le sang à l'origine d'un processus inflammatoire) voire des méningites dans le cas où il y a invasion du liquide céphalo-rachidien. Ce processus invasif met en jeu différents facteurs de virulence du pneumocoque, déclenchant un processus inflammatoire de la part de l'hôte. La réaction inflammatoire se traduit notamment par une augmentation significative du nombre de récepteurs de surface des cellules épithéliales (induits par des cytokines), devenant des cibles de choix pour un certain nombre de molécules de surface du pneumocoque.

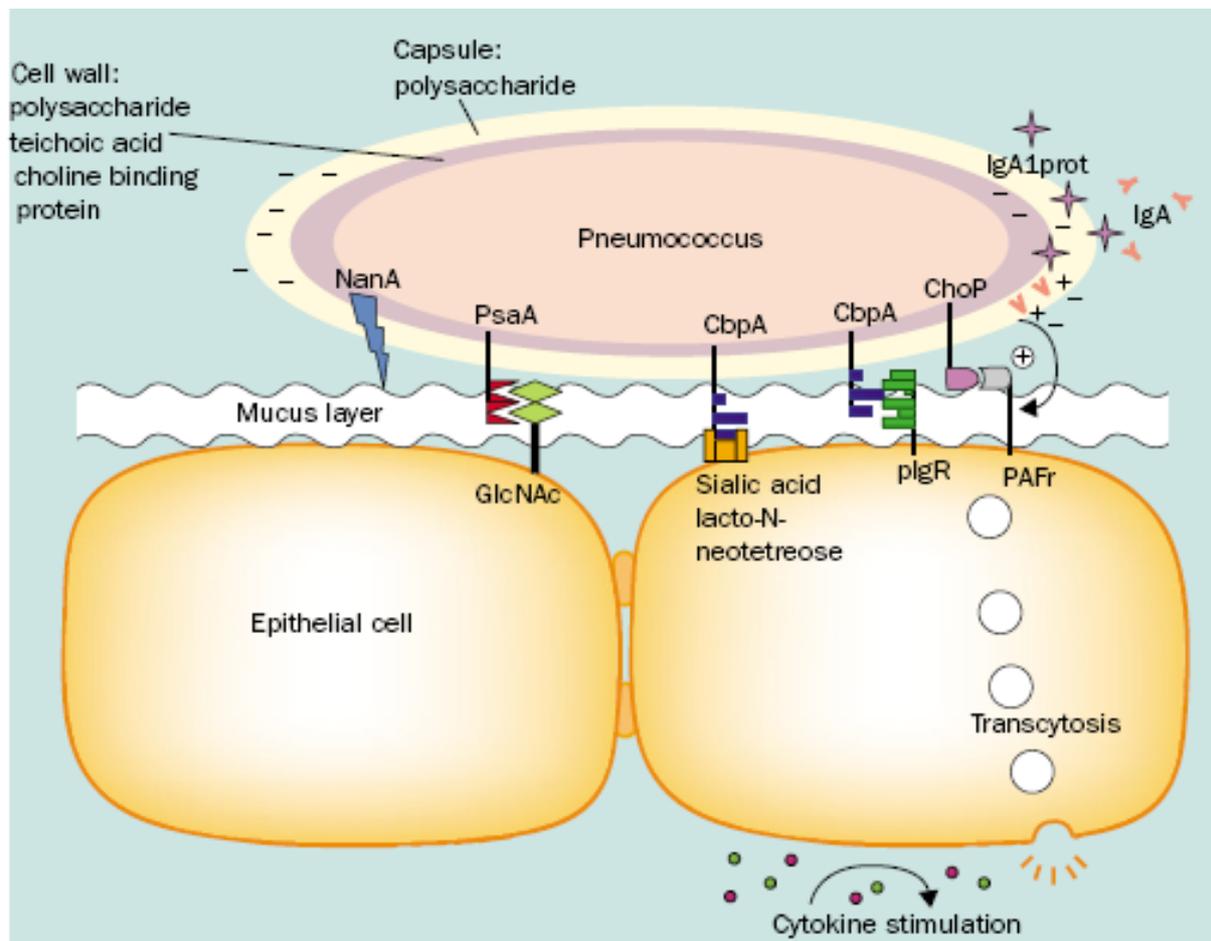


Figure 3. Principales interactions entre *S. pneumoniae* et les cellules épithéliales durant la phase de colonisation, et l'évolution vers un processus infectieux. D'après Bogaert *et al.*, 2004a.

Comme présenté en figure 3, une adhésine de surface (CbpA) se lie spécifiquement au récepteur plgR (dont la fonction normale est le transport d'immunoglobulines), et aux acides sialiques de surface (Rosenow *et al.*, 1997). De plus, la choline présente sur les acides teichoïques du pneumocoque interagit directement avec PAFr (récepteur du facteur d'activation plaquettaire) (Cundell *et al.*, 1995). Ces différentes interactions permettent un détournement de la machinerie d'endocytose des cellules épithéliales, à des fins de transcytose en direction de l'endothélium vasculaire et du flux sanguin. L'infection pneumococcique suit un cours différent selon les cas, pouvant être locale ou généralisée, ceci dépendant directement de la capacité de virulence des différentes souches, mais aussi de facteurs liés à l'hôte. En effet, il est aujourd'hui bien établi que certains sérotypes possèdent des capacités d'infections invasives plus élevées (Sandgren *et al.*, 2005). D'autre part, tout déficit immunitaire de la part de l'hôte entraîne des risques accrus d'infection sévère, expliquant le taux de mortalité important chez les sujets fragilisés. Au-delà, des études montrent que la contribution individuelle ou collective des différents facteurs de virulence varie en fonction de la localisation tissulaire du pneumocoque, ou encore du type de modèle animal utilisé lors d'expérimentations (Orihuela *et al.*, 2004; Sandgren *et al.*, 2004).

II.3 Potentialités métaboliques de *S. pneumoniae*

La survie d'une espèce tient, en particulier, dans sa capacité d'adaptation à son environnement. Un organisme, qu'il soit uni ou pluricellulaire, n'existe pas de façon isolée mais dans un milieu inconstant dont les fluctuations doivent être perçues puis intégrées, afin de pouvoir répondre de manière efficace et adéquate. Comme je l'ai décrit précédemment, le pneumocoque va rencontrer au cours de son processus de colonisation des environnements très différents dans lesquels il lui est nécessaire de s'adapter. En conséquence, le métabolisme central, qui constitue la centrale énergétique du microorganisme, est l'élément moteur de cette adaptabilité, et va en conséquence être soumis à des régulations permanentes. *S. pneumoniae* ne représente pas en tant que tel un modèle d'étude du métabolisme chez les bactéries lactiques, du fait notamment de son caractère pathogène. Ainsi, la majorité des études concernant cette bactérie (ainsi que d'autres pathogènes) traite essentiellement des mécanismes impliqués dans la pathogénicité, et la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques. Il existe donc extrêmement peu de données concernant la description du métabolisme de cette bactérie. Toutefois, le séquençage et l'annotation du génome, ainsi que

l'important niveau d'homologies avec *L. lactis*, permettent d'avoir une idée plus précise de son potentiel métabolique. J'effectuerai dans cette partie un descriptif des principales voies du métabolisme central du pneumocoque, ainsi que des mécanismes de régulations mis en jeu. La référence à des organismes modèles comme *B. subtilis* et *L. lactis* sera souvent mentionnée, ces deux espèces possédant un métabolisme central (et ses régulations) particulièrement bien décrit. Je tiens à noter que l'étude du métabolisme de *S. pneumoniae* fait l'objet d'un intérêt grandissant depuis les cinq dernières années, dans le cadre de l'établissement de connexions entre métabolisme et virulence.

II.3.1 Métabolisme carboné de *S. pneumoniae*

S. pneumoniae est une bactérie dite homolactique (Baltz *et al.*, 2000), ce qui signifie que la majorité du carbone disponible est converti en lactate via un métabolisme fermentaire, confirmé par la présence de l'ensemble des gènes codant pour la glycolyse (Tettelin *et al.*, 2001). De plus, ce microorganisme semble capable de métaboliser une large variété de sources carbonées, puisque les gènes de transport ou d'assimilation nécessaires à l'utilisation des sucres tels que le glucose, le fructose, le galactose, le lactose, le saccharose, le mannose ou le cellobiose, ont été mis en évidence (Tettelin *et al.*, 2001). En revanche, les gènes codant pour la respiration, le cycle du citrate et la gluconéogénèse sont manquants, impliquant que la fermentation des sucres constitue la source d'énergie exclusive pour cette bactérie. Après avoir présenté les différents mécanismes de transport, j'effectuerai un descriptif des voies de dégradation des sucres, et leurs principales connexions avec des métabolismes secondaires.

II.3.1.1 Le transport des sucres

Trois types de transports actifs de sucres sont présents chez les bactéries lactiques, avec en premier lieu le système phosphotransférase phosphoénolpyruvate (PEP) dépendant (PTS) couplant le transport et la phosphorylation du glucide (phosphorylation en cascade). On trouve ensuite le système ATP binding cassette et le système perméase énergie-dépendant, qui font pénétrer les glucides sous forme de sucres libres. Le séquençage du génome de *S. pneumoniae* a confirmé l'implication des systèmes PTS et ABC dans le transport de la majorité des sucres (table 2).

✓ Le Système PTS

Il s'agit d'un mécanisme de translocation phosphorylant le substrat en lui faisant traverser la membrane. Il est doté de plusieurs composantes : deux protéines cytoplasmiques, l'enzyme I (60 kD) et HPr (Histidine phosphoprotein, 10 kD) communes à tous les PTS, et d'une perméase EII spécifique du sucre (Postma *et al.*, 1993). La perméase EII est composée d'une ou plusieurs protéines constituant plusieurs domaines (A, B, et C), couvrant les zones cytoplasmiques et membranaires. Le groupe phosphate est transféré du PEP jusqu'au sucre via la phosphorylation des différents intermédiaires EI, HPr, EIIA et EIIB (figure 4). Le domaine EIIC est membranaire et assure la translocation du sucre (Postma *et al.*, 1993).

✓ Le système ATP-binding cassette (ABC)

Ce système présenté en figure 5A est composé de trois composantes, à savoir une protéine liant le substrat, deux perméases membranaires et une protéine liant l'ATP. Comme présenté en table 2, 7 systèmes ABC ont été identifiés comme impliqués dans le transport des sucres chez *S. pneumoniae*. A la différence des perméases qui utilisent un gradient, l'ATP est utilisé pour énergétiser spécifiquement le transporteur (Konings W.N., 1994).

✓ Le système perméase

Ce système de transport est basé sur la théorie chimiosmotique de Mitchell, selon laquelle l'hydrolyse d'une molécule d'ATP est couplée à la sortie de protons de la cellule. Cette énergie est donc à l'origine d'un potentiel électrochimique de protons à travers la membrane (force protomotrice). L'entrée du sucre s'effectue par un système de type symport- H^+ spécifique du sucre (Konings W.N., 1994). Les sucres sont phosphorylés ultérieurement dans la cellule par des kinases ATP-dépendantes (figure 5B). Les exemples les plus connues chez les bactéries lactiques sont les symports lactose/ H^+ et mélibiose/ Na^+ perméase.

✓ Facilitateurs

Il s'agit du seul système de transport de sucres qui n'utilise pas d'énergie, mais facilite seulement la diffusion : facilitateur du glycérol (GlpF, présent chez *S. pneumoniae*) ou du propanediol (PduF) (Deutscher *et al.*, 2006).

Table 2. Transporteurs de sucres identifiés chez *S. pneumoniae*. D'après Tettelin *et al.*, 2002.

Type de transporteur	Nombre de transporteurs identifiés	Sucres transportés
Système PTS	21	glucose, fructose, mannose, lactose, saccharose, trehalose, cellobiose, mannitol, N-acétyl glucosamine, sorbose, pentitol, galactitol, β -glucosides
Système ABC	7	galactose, glycérol, raffinose, maltose, maltodextrines, ribose

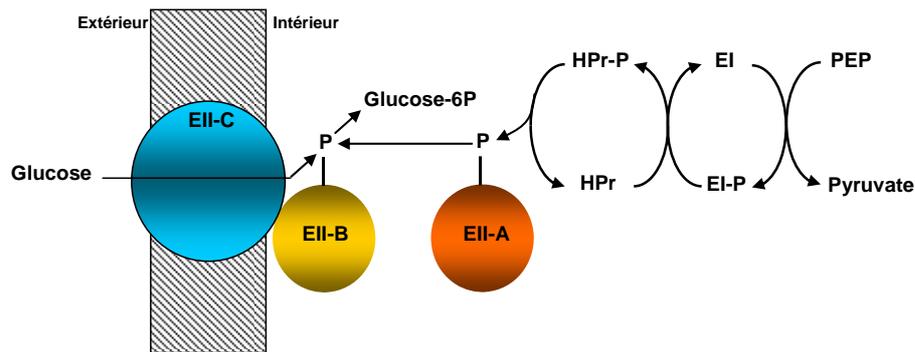


Figure 4. Système PTS Glucose. D'après Postma *et al.*, 1993.

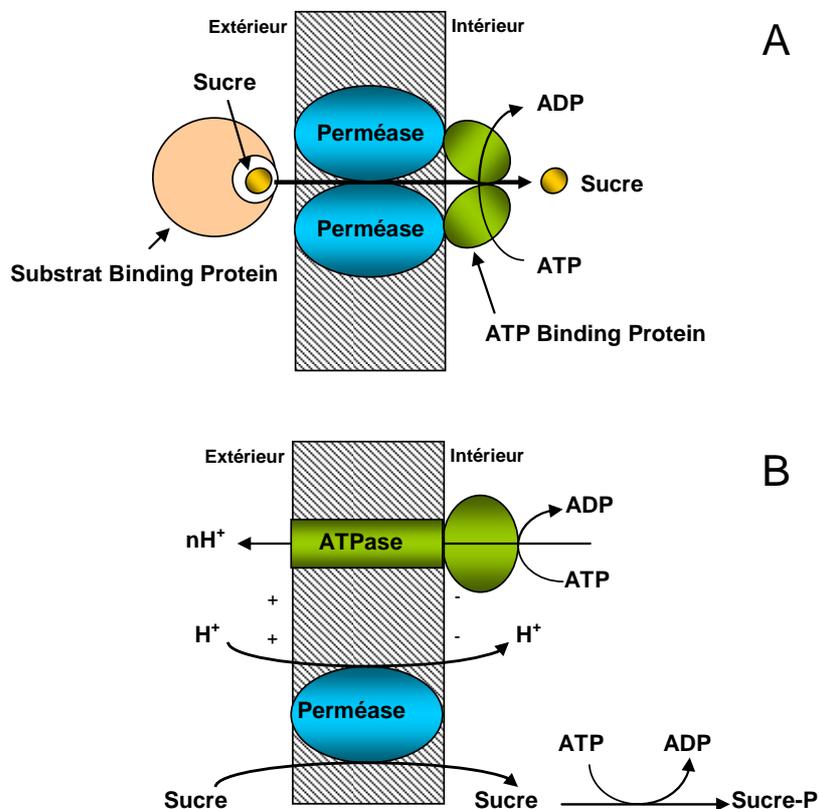


Figure 5. Système Transporteur ABC (A) et Perméase (B). D'après Konings *et al.*, 1994.

II.3.1.2 Le catabolisme des sucres

Je prendrai à titre d'exemple quatre sucres représentatifs que sont le glucose, le saccharose, le lactose et le galactose, pour décrire les différentes voies du métabolisme carboné. Après leur entrée dans le milieu intracellulaire, les différents sucres rejoignent le flux glycolytique soit directement comme le glucose, soit en utilisant des voies alternatives (figure 6). Le saccharose après phosphorylation au niveau du PTS, est scindé en G6P et fructose, ce dernier étant phosphorylé via une fructokinase (F6P) pour rejoindre la glycolyse. Le lactose, après phosphorylation, est scindé en glucose et galactose 6-P par une 6-phospho-beta-galactosidase, le premier étant phosphorylé en G6P via une glucokinase, et le deuxième empruntant la voie du tagatose pour rejoindre la glycolyse au niveau des trioses phosphates. Le galactose emprunte un système perméase, puis la voie de Leloir pour être phosphorylé. Il s'agit dans tous les cas de voies classiquement rencontrées chez les bactéries lactiques. Le flux glycolytique se poursuit jusqu'à l'oxydation du pyruvate, la consommation d'une molécule de glucose entraînant la production de 2 molécules de pyruvate, 2 ATP et 2 NADH + H⁺. On considère que le métabolisme carboné est essentiellement dédié à la production d'énergie dans les bactéries lactiques, ne contribuant que très faiblement dans la synthèse de biomasse. Comme présenté en figure 6, le métabolisme carboné constitue le point d'ancrage de différents métabolismes primordiaux pour la bactérie. Le premier point essentiel se situe au niveau du G6P, où la majorité du flux carboné est orientée vers la glycolyse afin d'assurer la production énergétique. Toutefois, plusieurs déviations existent à ce niveau, avec en particulier la voie des pentoses phosphates permettant d'une part, la synthèse de précurseurs réduits de type NADPH (nécessaire à l'anabolisme), et d'autre part la synthèse des précurseurs nécessaires à la synthèse des nucléotides (comme le ribose 5-phosphate). Par ailleurs, une partie du G6P est déviée vers le métabolisme des sucres nucléotides, à l'origine de la voie de synthèse du polysaccharide capsulaire. Une déviation existe aussi au niveau du F6P vers le métabolisme des aminosucres, conduisant à la synthèse d'éléments structurels pour la bactérie comme la paroi et les acides teichoïques. Le deuxième point essentiel se situe au niveau du pyruvate, dont une faible part est orientée vers la synthèse des acides aminés branchés (BCAA), la majorité partant vers les voies fermentaires détaillées ci-après. Enfin, deux liens directs avec le métabolisme des lipides sont présents, à savoir l'acétyl CoA orienté vers la synthèse des acides gras, et le GAP, précurseur du métabolisme des glycérolipides.

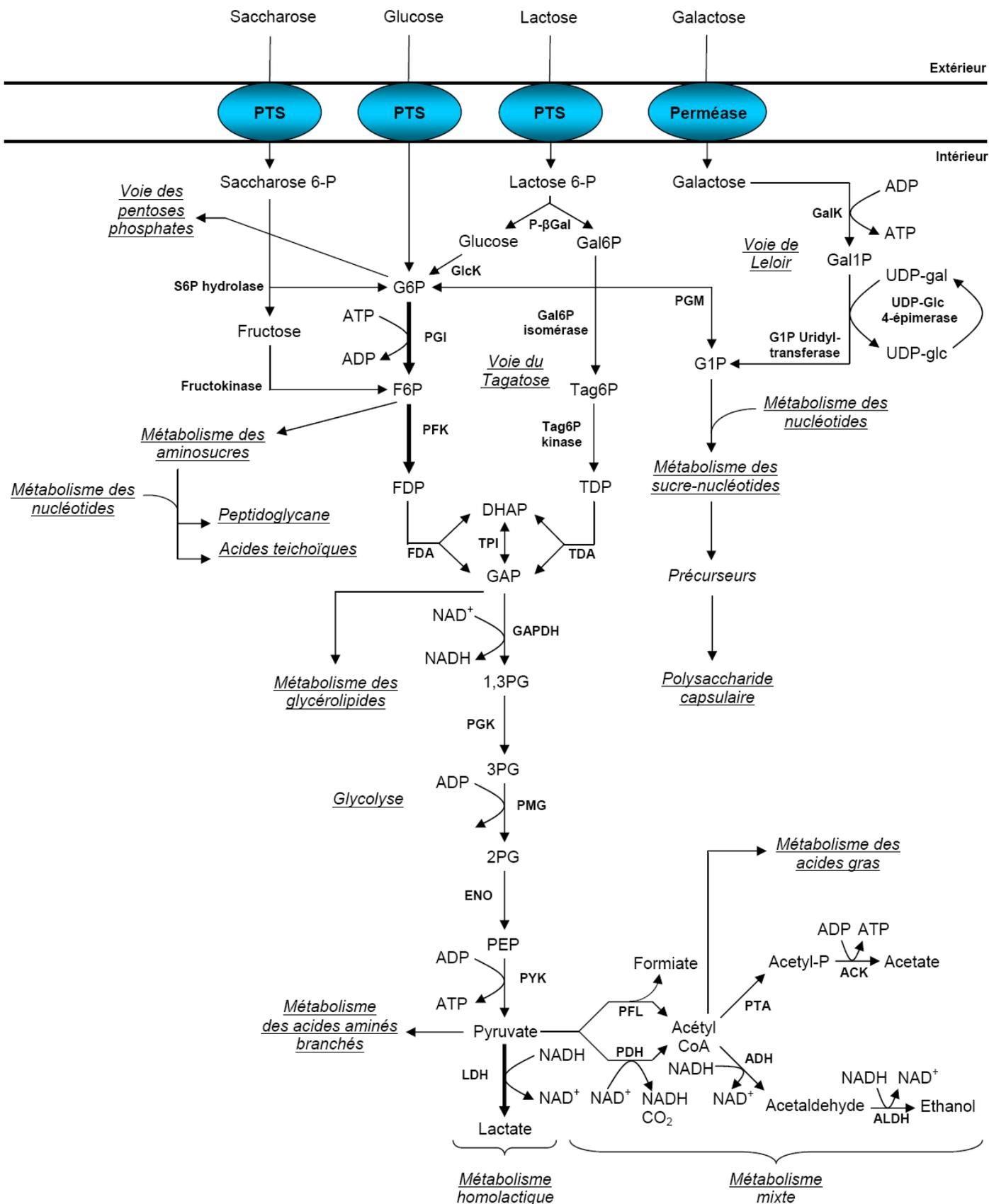


Figure 6. Métabolisme carboné de *S. pneumoniae*, et ses différentes connexions.

Glc : glucose, G6P : glucose-6-phosphate, G1P : glucose-1-phosphate, Gal6P : galactose-6-phosphate, Gal1P : galactose-1-phosphate, Tag6P : tagatose-6-phosphate, TDP : tagatose-1,6-diphosphate F6P : fructose-6-phosphate, FDP : fructose-1,6-diphosphate, DHAP, dihydroxyacétone-phosphate, GAP : glycéraldéhyde-3-phosphate, 1,3PG : 1,3-diphosphoglycérate, 3PG : 3-phosphoglycérate, 2PG : 2-phosphoglycérate, PEP : phosphoenolpyruvate, GlcK : glucokinase, PGI : glucose-6-phosphate isomérase, PFK : phosphofructokinase, FDA : fructose-1,6-diphosphate aldolase, TDA : tagatose-1,6-diphosphate aldolase, TPI : triose-phosphate isomérase, GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, PGK : phosphoglycérate kinase, PMG : phosphoglycérate mutase, ENO : énonase, PYK : pyruvate kinase, GalK : galactokinase, PGM : phosphoglucomutase, P-βgal : 6-phospho-beta-galactosidase, G6PDH : G6P déshydrogénase, LDH : lactate déshydrogénase, PFL : pyruvate formiate lyase, PDH : pyruvate déshydrogénase, PTA : phosphate acétyl transférase, ACK : acétate kinase, ADH : aldéhyde déshydrogénase, ALDH : alcool déshydrogénase. Les flèches en gras signifient que le flux carboné est essentiellement orienté dans la direction indiquée.

✓ Métabolisme homolactique

S. pneumoniae étant défini comme une bactérie homolactique, le pyruvate issu de la glycolyse est majoritairement converti en acide lactique via la lactate déshydrogénase (figure 6), permettant notamment la réoxydation du NADH en NAD⁺.

✓ Métabolisme mixte

Dans certaines conditions (milieu appauvri, sur certaines sources de carbone, souche mutée, limitation carbone), les bactéries lactiques peuvent présenter un métabolisme dit « mixte », caractérisé par la production d'acide lactique mais aussi d'acide acétique, d'éthanol et d'acide formique et/ou de CO₂ selon l'environnement gazeux, aérobie ou anaérobie (Cocaign-Bousquet *et al.*, 1996). Comme présenté en figure 6, *S. pneumoniae* possède l'ensemble des enzymes de ces voies fermentaires. La voie empruntée par les sucres est commune au métabolisme homolactique jusqu'au pyruvate. Celui-ci est alors converti en acétyl CoA par la pyruvate deshydrogénase (formation de CO₂), ou par la pyruvate formiate lyase (formation de formiate). Concernant la régulation de cette voie, elle n'a été largement décrite que chez *L. lactis* où en aérobiose, l'activité pyruvate formiate lyase est inhibée par la très forte sensibilité de cette enzyme à l'oxygène (Melchiorson *et al.*, 2000). En anaérobie, la pyruvate deshydrogénase est inhibée (Snoep *et al.*, 1992), et seule la voie de la pyruvate formiate lyase est empruntée. Dans ce cas, l'acétyl CoA est ensuite converti en acétate par la phosphotransacétylase et l'acétate kinase, et en éthanol par l'aldéhyde deshydrogénase et l'alcool deshydrogénase avec une stoechiométrie 1:1, imposée par l'équilibre redox et la régénération des coenzymes réduits (figure 6). La production d'acétate permet de produire un ATP supplémentaire par rapport à la voie homolactique, et donc d'augmenter le rendement énergétique. Le shift entre métabolisme homolactique et métabolisme mixte chez *L. lactis* a été démontré comme directement dépendant du ratio NADH⁺/NAD (décrit en détail ci-après) (Garrigues *et al.*, 1997). Ainsi, la bactérie percevant le plus souvent des conditions défavorables dans son environnement naturel possède la capacité de dévier son métabolisme vers des voies pour lesquelles le bilan énergétique est meilleur. Au delà, ces différentes voies participent efficacement au recyclage du NADH produit par la glycolyse. Ce modèle décrit chez *L. lactis* est directement transposable à *S. pneumoniae* (comme je le détaillerai plus loin), en accord avec la faculté d'adaptabilité environnementale de ce microorganisme. Je noterai pour finir que le pyruvate, en présence d'oxygène, peut être directement pris en charge par la

pyruvate oxydase générant de l'acetyl phosphate et de l' H_2O_2 (l'aspect oxygène est détaillé dans le paragraphe II.3.1.4).

II.3.1.3 Régulation du catabolisme des sucres

La régulation du catabolisme des sucres n'est que faiblement étudiée chez *S. pneumoniae*. Toutefois, les différents mécanismes mis en évidence chez *L. lactis* (et d'autres bactéries lactiques) que je décrirai dans cette partie sont directement transposables au pneumocoque.

✓ Régulation de l'entrée des sucres

En présence de deux sucres, l'un permettant une croissance rapide (glucose) et l'autre une croissance plus lente (lactose), on observe classiquement un comportement diauxique des bactéries lactiques, préférant métaboliser dans un premier temps le sucre dit "rapide" puis le sucre "lent" (Thompson *et al.*, 1978). L'existence de ce phénomène suggère une utilisation préférentielle d'un substrat par rapport à un autre. Les mécanismes de régulation de l'entrée des sucres sont pour la plupart étudiés au niveau des systèmes PTS et basés sur plusieurs principes : la compétition, les mécanismes d'exclusion et d'expulsion, et le contrôle de l'expression de certains gènes (répression catabolique) qui sera détaillée plus loin (cf. paragraphe II.4.2). Un mécanisme de compétition au niveau d'un même système PTS peut s'instaurer, en raison des différences d'affinité pouvant exister entre les sucres et une protéine EII commune, et / ou la compétition des divers EII pour le donneur commun de phosphoryl, la protéine HPr. Ainsi, la protéine HPr, composante du système PTS (figure 4), joue un rôle fondamental dans la régulation des systèmes de transport et notamment du PTS (Saier, Jr. *et al.*, 1996). Cette protéine est classiquement phosphorylée sur l'histidine 15, dans le cadre de sa fonction au sein du PTS (transfert de phosphate). Dans le cas d'un flux glycolytique élevé (glucose), l'accumulation de fructose-1,6-diphosphate au niveau de la glycolyse peut également activer la phosphorylation de l'HPr sur la sérine 46, via une HPr kinase. Cette deuxième configuration de la protéine HPr n'a que peu d'affinité pour la cascade de phosphorylation des PTS de sucres alternatifs, et peut lier plusieurs protéines cibles (perméases ou enzymes du catabolisme) impliquées dans l'assimilation de sucres alternatifs

comme le lactose. Cette liaison provoque l'inhibition des protéines cibles, et évite l'entrée ou la production intracellulaire de l'inducteur correspondant : c'est le mécanisme d'exclusion de l'inducteur (Deutscher *et al.*, 2006). Toutefois, il n'existe que 3 cas où l'implication de la HPr(ser)P dans le mécanisme d'exclusion de l'inducteur a été vérifiée par des études *in vivo*. C'est le cas pour le système de transport du maltose chez *L. casei* (Viana *et al.*, 2000), et pour les systèmes de transport du maltose (figure 7) et du ribose chez *L. lactis* (Monedero *et al.*, 2001). Streptocoques et lactocoques transportent différents sucres non métabolisables comme le méthyl- β -D-thiogalactoside (TMG) ou encore le 2-deoxy-D-glucose (2DG), via les systèmes PTS, et les accumulent sous formes de sucres phosphates. De façon intéressante, ces sucres sont rapidement expulsés de la cellule en présence d'une source de carbone rapidement métabolisable comme glucose, saccharose ou mannose. Ce mécanisme d'expulsion est constitué de deux étapes : les sucres-P sont d'abord déphosphorylés au niveau intracellulaire puis expulsés : c'est le mécanisme d'expulsion de l'inducteur. La HPr(ser)P ne semble pas jouer un rôle dans ce mécanisme, des mutants de *L. casei* et *L. lactis*, qui ne produisent pas de HPr(ser)P, présentant toujours le phénomène (Deutscher *et al.*, 2006). Ainsi, il existe probablement des sucres-phosphate phosphatases spécifiques qui sont impliquées dans l'expulsion de l'inducteur.

✓ Régulation du shift homolactique / mixte

Les conditions environnementales peuvent provoquer une transition entre métabolisme homolactique et métabolisme mixte. Le modèle de régulation établi par Garrigues *et al.* (1997) chez *L. lactis* attribue au ratio $\text{NADH} / \text{NAD}^+$ un rôle majeur dans l'orientation du métabolisme par un contrôle négatif de la glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase, et positif de la lactate deshydrogénase (figure 8). Dans le cas d'un flux glycolytique élevé (métabolisme du glucose), le ratio $\text{NADH} / \text{NAD}^+$ élevé active l'activité lactate deshydrogénase et inhibe la glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase, enzyme consommatrice de NAD^+ . Il en résulte une augmentation des concentrations intracellulaires de dihydroxyacétone phosphate, glycéraldéhyde-3-phosphate et fructose-1,6-diphosphate. Les trioses phosphate sont alors présents dans la cellule à des concentrations telles qu'ils inhibent la pyruvate formiate lyase, le flux glycolytique déviant majoritairement vers la lactate deshydrogénase (métabolisme homolactique). Lorsque le flux glycolytique est plus faible (lactose ou limitation carbone), le ratio $\text{NADH} / \text{NAD}^+$ plus faible inhibe très fortement la lactate deshydrogénase. L'inhibition de la glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase par le

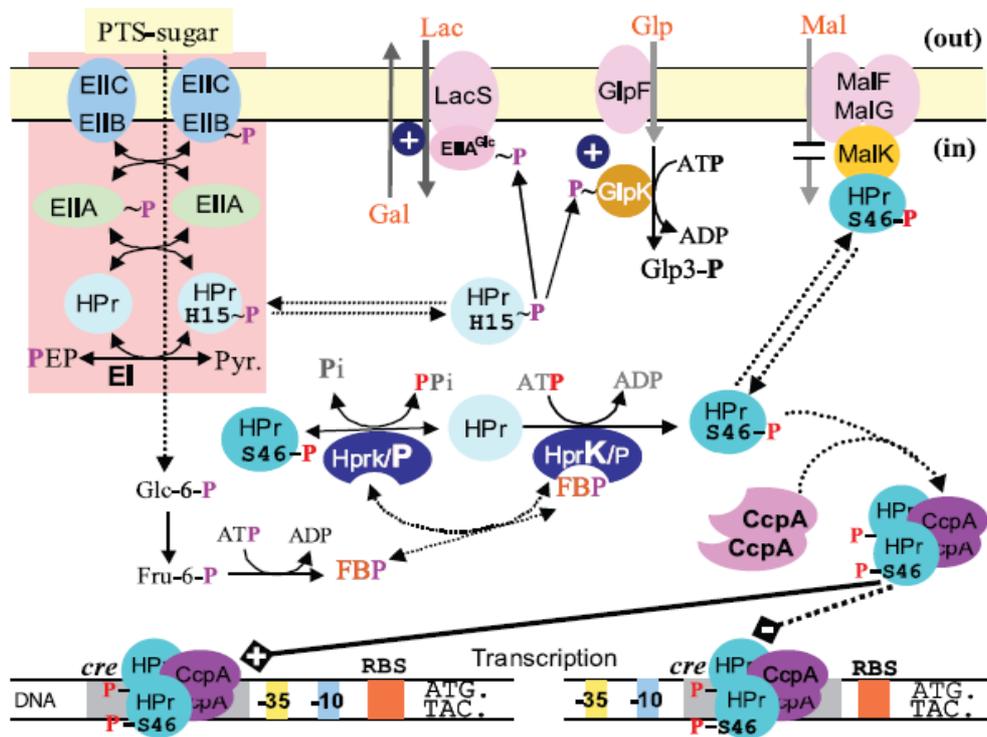


Figure 7. Ensemble des mécanismes sous-tendant la répression / activation catabolique chez les firmicutes (Gram+ à faible niveau en GC). D'après Deutscher *et al.*, 2006.

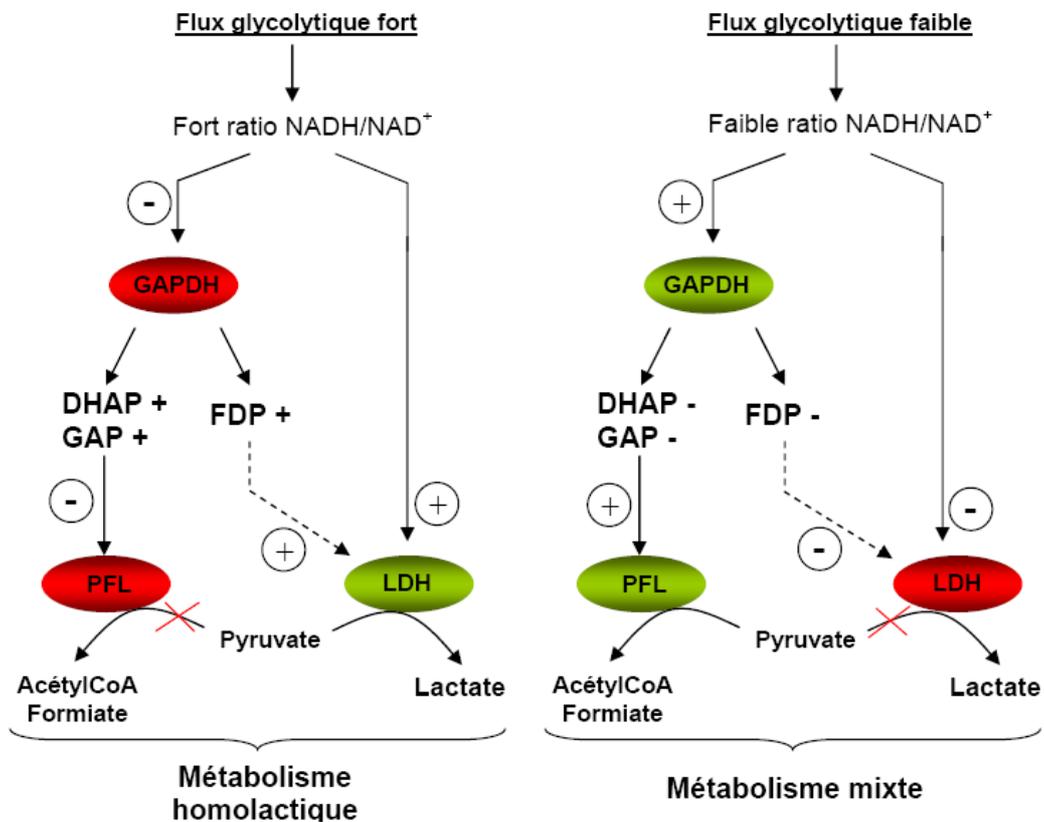


Figure 8. Modèle de régulation du shift métabolisme homolactique / métabolisme mixte chez *L. lactis*. D'après Garrigues *et al.*, 1997.

ratio NADH / NAD⁺ est plus faible et l'enzyme est alors en excès par rapport au flux. Les concentrations intracellulaires de trioses phosphate et de fructose-1,6-diphosphate restent faibles et la pyruvate formiate lyase n'est pas inhibée (le métabolisme est mixte). Nous verrons plus loin que ce modèle a constitué le point de départ de l'établissement de connexions entre le métabolisme central et la virulence du pneumocoque. Le rôle essentiel de la glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase dans la régulation et l'orientation du métabolisme a été confirmé par une approche de type contrôle métabolique (Even *et al.*, 1999). L'ajout de concentrations croissantes d'iodoacétate, un inhibiteur chimique de la glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase, dans des conditions où elle n'est pas limitante, provoque une inhibition graduelle de cette enzyme couplée avec la restauration d'un métabolisme homolactique.

II.3.1.4 Tolérance vis-à-vis de l'oxygène

S. pneumoniae est une bactérie anaérobie facultative, ne possédant pas de métabolisme respiratoire. Toutefois, sa capacité de colonisation au niveau des voies aériennes supérieures de l'homme signifie qu'elle possède différents mécanismes susceptibles de prendre en charge l'oxygène. Deux enzymes assurent ce rôle : la NADH oxidase et la pyruvate oxidase (codées par les gènes *nox* et *spxB*). La NADH oxidase produit de l'H₂O et du NAD⁺, participant probablement à la modification de l'équilibre redox de la cellule en présence d'oxygène (Chapuy-Regaud *et al.*, 2001). La pyruvate oxidase est quant à elle productrice de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), molécule toxique pour la bactérie elle-même (pas d'activité catalase), mais aussi pour son environnement. Ainsi, la production d' H₂O₂ par le pneumocoque favorise sa propre colonisation des voies respiratoires, de par l'effet bactéricide sur les autres populations bactériennes (Pericone *et al.*, 2000).

II.3.2 Métabolisme azoté de *S. pneumoniae*

Le métabolisme azoté reste lui aussi faiblement documenté chez *S. pneumoniae*, même si le séquençage du génome a permis de confirmer l'existence de voies relativement similaires à celles déjà identifiées chez *L. lactis*. Une des caractéristiques premières des bactéries lactiques est la haute exigence nutritionnelle, nécessitant l'utilisation de milieux

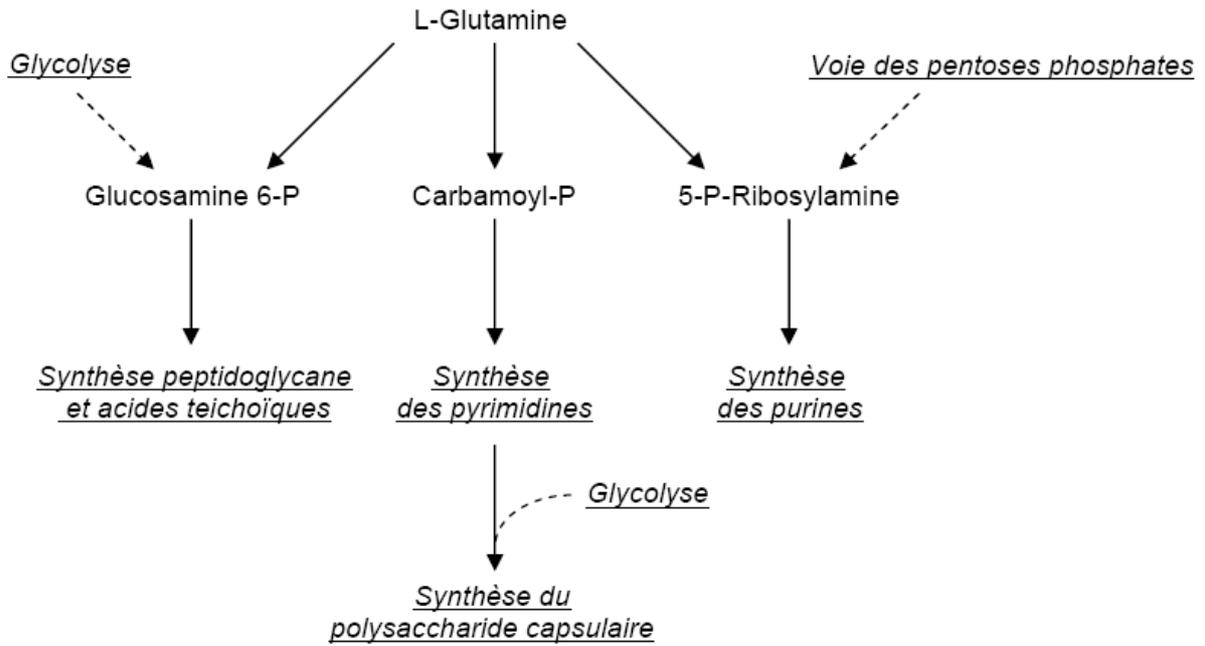


Figure 9. Implication de la glutamine dans le métabolisme central de *S. pneumoniae*. Les flèches en pointillés représentent les connexions avec le métabolisme du carbone.

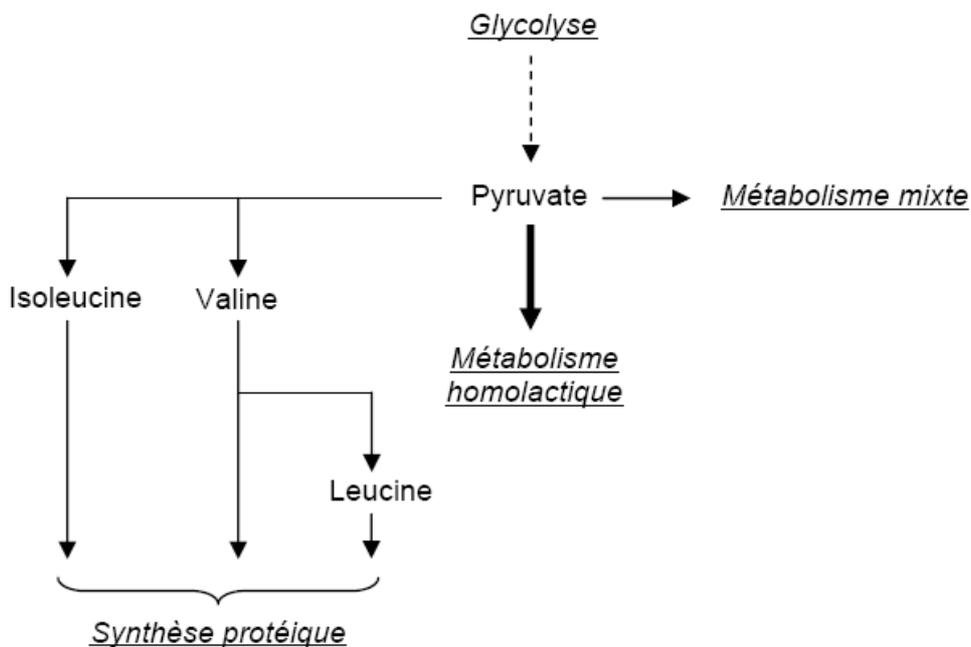


Figure 10. Voie de synthèse des acides aminés branchés chez *S. pneumoniae*. Les flèches en gras signifient que le flux carboné est essentiellement orienté dans la direction indiquée.

complexes pour obtenir de bonnes conditions de croissance. Cette exigence est étroitement liée à l'absence du cycle de Krebs, qui constitue un point central pour la synthèse d'un certain nombre d'acides aminés. Ainsi, le pneumocoque est incapable de synthétiser l'aspartate, le glutamate, la lysine, la méthionine, la glycine, l'histidine ou la thréonine (Hoskins *et al.*, 2001), d'où la nécessité de compléter le milieu de culture avec ces différents composés. La glutamine semble constituer un élément clé pour la croissance du pneumocoque, son rôle ayant déjà été mis en évidence chez *Streptococcus mutans* (Dashper *et al.*, 1995). En effet, l'annotation du génome de *S. pneumoniae* a permis d'identifier 22 gènes codant pour 7 transporteurs de type ABC spécifiques à la glutamine, suggérant que son rôle se situe au-delà de la synthèse protéique (Hoskins *et al.*, 2001). L'analyse du métabolisme central et de ses différentes connexions permet de voir, comme présenté en figure 9, que la glutamine est directement impliquée dans plusieurs voies primordiales du pneumocoque. En effet, il s'agit d'un précurseur essentiel pour la synthèse des purines et des pyrimidines (synthèse des nucléotides), pour la synthèse du polysaccharide capsulaire, et enfin du métabolisme des aminosucres nécessaire à la synthèse du peptidoglycane et des acides teichoïques. Il est intéressant de noter que la glutamine est l'acide aminé le plus représenté dans le sang (Bachmann *et al.*, 1979), qui constitue la niche écologique la plus favorable pour la synthèse du polysaccharide capsulaire (Kim et Weiser, 1998). Un dernier point à souligner concernant le métabolisme azoté de *S. pneumoniae* est l'existence d'une voie de synthèse des acides aminés branchés (isoleucine, valine et leucine). Comme présenté en figure 10, celle-ci est directement connectée au métabolisme central via le pyruvate, et permet la synthèse de la valine, la leucine et l'isoleucine. Un transporteur de type perméase assure le transport spécifique de ces acides aminés (Tettelin *et al.*, 2001). Concernant la choline, amino-alcool indispensable au pneumocoque, je tiens à noter qu'un paragraphe lui est spécifiquement dédié plus loin (paragraphe III.2).

II.4 Les gènes du métabolisme central et leurs régulations

Les potentialités de régulation de *S. pneumoniae* ont pu être établies grâce au séquençage du génome. De façon assez remarquable, *S. pneumoniae* ne possède que deux facteurs transcriptionnels sigma (σ), contre 3 chez *L. lactis*, ou encore 18 chez *B. subtilis*. Le rôle essentiel du facteur σ est de se lier au cœur de l'ARN polymérase, lui conférant sa

Table 3. Les principaux gènes de transport des sucres chez *S. pneumoniae*. D'après Hoskins *et al.*, 2001.

Gène	Numéro d'identification	Fonction	Séquence -10
<i>Systèmes PTS</i>			
<i>ptsHI</i>	<i>spr1062, spr1063</i>	Phosphocarrier protein of the PTS, PTS enzyme I	TATAAT
<i>ptsG</i>	<i>spr0668</i>	PTS glucose-specific enzyme IIABC	TATAAT
<i>fruBA</i>	<i>spr0780, spr0781</i>	PTS fructose-specific enzyme IIBC	TAGAAT
<i>manLNM</i>	<i>spr0259, spr0260, spr0261</i>	PTS mannose-specific enzyme EIIAB, PTS mannose-specific enzyme IIC, PTS mannose-specific enzyme IID	TATGAT
<i>lacEF</i>	<i>spr1070, spr1071</i>	PTS lactose-specific enzyme IIBC, PTS lactose-specific enzyme II	TATAAA
<i>scrA</i>	<i>spr1566</i>	PTS sucrose-specific enzyme II	TATAAG
<i>treP</i>	<i>spr1699</i>	PTS trehalose-specific enzyme IIBC	TACAAT
<i>ptcCBA</i>	<i>spr1834, spr1835, spr1836</i>	PTS cellobiose-specific enzyme IIC, PTS cellobiose-specific enzyme IIB, PTS cellobiose-specific enzyme IIA	TATAAT
<i>mltAF</i>	<i>spr0356, spr358</i>	PTS mannitol-specific enzyme IIB, PTS mannitol-specific enzyme IIA	TATACT
<i>ND**</i>	<i>spr0291, spr0293, spr0294, spr0295</i>	PTS N-acetyl glucosamine specific enzyme IIA, PTS N-acetyl glucosamine specific enzyme IIB, PTS N-acetyl glucosamine specific enzyme IIC, PTS N-acetyl glucosamine specific enzyme IID	TACAAT
<i>ND</i>	<i>spr0060, spr0061, spr0062, spr0063</i>	PTS mannose* specific enzyme IIB, PTS mannose* specific enzyme IIC, PTS mannose* specific enzyme IID, PTS mannose* specific enzyme IIA	TATAAC
<i>gatCAB</i>	<i>spr564, spr563, spr562</i>	PTS galactitol specific enzyme IIC, PTS galactitol specific enzyme IIC	TAAAT
<i>bglF</i>	<i>spr0505</i>	PTS beta-glucoside specific enzyme II	TATAAG
<i>Transporteurs ABC</i>			
<i>malXCD</i>	<i>spr1918, spr1919, spr1920</i>	Maltose / maltodextrin ABC transporter	TATACT
<i>ND</i>	<i>spr0748, spr0749, spr0750</i>	Ribose / Galactose ABC transporter	TAAAAT
<i>msmEFG</i>	<i>spr1710, spr1709, spr1708</i>	Multiple sugars (raffinose) ABC transporter	TATAAA
<i>Faciliteur</i>			
<i>glpF</i>	<i>spr1988</i>	Glycerol uptake facilitator	TATACT

* assure également le transport du sorbose

** pas de nom attribué

spécificité de reconnaissance des promoteurs. La majorité des gènes de *S. pneumoniae* présentent un promoteur consensuel reconnu par le facteur σ , codé par le gène *rpoD*. D'autre part, un seul facteur σ alternatif a été identifié chez *S. pneumoniae*, à savoir ComX, impliqué notamment dans la régulation des gènes de la compétence (Lee et Morrison, 1999).

Dans cette partie, je décrirai les différents systèmes de régulation mis en jeu au niveau du métabolisme carboné et azoté du pneumocoque, en précisant au préalable les différents gènes impliqués. Je prendrai généralement exemple sur *L. lactis* et *B. subtilis*, dont les mécanismes de régulation ont été le plus souvent transposés à *S. pneumoniae*. Afin de clarifier la suite de l'exposé, je souhaite préciser que les noms des gènes utilisés ici correspondent à ceux de la souche non pathogène R6, souche référence dans la plupart des publications concernant le pneumocoque.

II.4.1 Les gènes du métabolisme carboné

✓ Le transport des sucres

Comme déjà présenté, le transport des sucres est assuré chez le pneumocoque par deux types de transporteurs : le système PTS et le système ABC. L'ensemble des gènes codants pour ces différents transporteurs est présenté en table 3. Concernant le système PTS, les gènes codant pour les protéines EI et HPr, communes aux différents systèmes PTS, sont portés par l'opéron *ptsHI*, de la même manière que chez *L. lactis* (Luesink *et al.*, 1999). Pour la majorité de ces gènes, on trouve une organisation en opéron avec des séquences promotrices -10 et -35 proches des séquences consensus (TATAAT et TTGACA respectivement). Les RBS (ribosome binding site) de ces gènes sont également proches de la séquence consensus (GGAGG).

✓ Le catabolisme des sucres

La table 4 présente les gènes impliqués dans les voies de dégradation du glucose, du galactose, du lactose et du saccharose, d'après les données disponibles via le séquençage du génome. La plupart des gènes du métabolisme carboné de *S. pneumoniae* présente, de la même manière que les gènes impliqués dans le transport des sucres, des séquences promotrices proches des séquences consensus.

Table 4. Les principaux gènes du catabolisme des sucres chez *S. pneumoniae*. D'après Hoskins *et al.*, 2001.

Gène	Numéro d'identification	Fonction	Séquence -10
<i>scrB</i>	<i>spr1568</i>	Sucrose-6-phosphate hydrolase	TATGAT
<i>scrK</i>	<i>spr1565</i>	Fructokinase	(ext ^a)TATAAT
<i>lacG</i>	<i>spr0424</i>	6-phospho beta-galactosidase	TATATT
<i>glcK</i>	<i>spr0584</i>	Glucokinase	TATACT
<i>galKT</i>	<i>spr1667, spr1668</i>	G1P-uridyltransférase, Galactokinase	TACAAT
<i>galE</i>	<i>spr1460</i>	UDP-glucose 4-epimerase	TATATT
<i>lacABCD</i>	<i>spr1073, spr1074, spr1075, spr1076</i>	Galactose-6-phosphate isomerase, tagatose-6-phosphate kinase, tagatose 1,6-diphosphate aldolase	TATTAT
<i>pgm</i>	<i>spr1351</i>	Phosphoglucomutase	TATAAT
<i>gpi</i>	<i>spr1882</i>	Glucose-6-phosphate isomerase	TATGAT
<i>pfkA-pykF</i>	<i>spr0796, spr0797</i>	6-phosphofructokinase, pyruvate kinase	(ext)TATAAT
<i>fba</i>	<i>spr0530</i>	Fructose-bisphosphate aldolase	TAAAAT
<i>tpi</i>	<i>spr1432</i>	Triose phosphate isomerase	(ext)TATAAT
<i>gapA</i>	<i>spr1825</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	TATAAT
<i>pgk</i>	<i>spr0441</i>	Phosphoglycerate kinase	(ext)TATAAT
<i>gpmB</i>	<i>spr0219</i>	Phosphoglyceromutase	TATAAT
<i>eno</i>	<i>spr1036</i>	Enolase	TATTAT
<i>ldh</i>	<i>spr1100</i>	L-lactate dehydrogenase	TAGAAT
<i>pflF</i>	<i>spr0232</i>	Pyruvate formate lyase	TATTAT
<i>acoABC</i>	<i>spr1048, spr1049, spr1050</i>	Pyruvate dehydrogenase	TAAAAT
<i>pta</i>	<i>spr1007</i>	Phosphate acetyltransferase	TATAAT
<i>ackA</i>	<i>spr1854</i>	Acetate kinase	(ext)TATAAT
<i>adhE</i>	<i>spr1837</i>	Alcohol dehydrogenase	TACAAT

^a TATA étendue dont le consensus chez le pneumocoque est : TNTGNTATAAT (N= A, T, G ou C). La présence d'une TATA étendue se traduit par l'absence de la séquence -35.

Par ailleurs, la plupart de ces gènes présente un important biais de codon (Karlin *et al.*, 2004), ce qui est généralement observé pour des gènes fortement exprimés. Il s'agit là d'une caractéristique propre aux Eucaryotes et aux Procaryotes, liée au fait que les différents codons associés à un même acide aminé ne sont pas présents à la même fréquence dans les ARNm. Dans le cas de gènes fortement exprimés, on observe ainsi l'utilisation privilégiée d'un des codons d'un même acide aminé, la traduction se déroulant d'autant plus vite que l'on utilise des codons synonymes, correspondant aux ARNt les plus abondants.

L'analyse des cadres ouverts de lecture situés de part et d'autre des gènes glycolytiques montre que 11 gènes sont organisés en opéron : les gènes impliqués dans la voie de Leloir (*galKT*), dans la voie du Tagatose (*lacABCD*), les gènes codant pour les différentes sous unités de la pyruvate déshydrogénase (*acoABC*), et les gènes de la phosphofructokinase et de la pyruvate kinase (*pfkA-pykF*). Concernant ces deux derniers gènes, on peut noter la différence d'organisation de *S. pneumoniae* vis-à-vis de *L. lactis*, pour laquelle *pfkA* et *pykF* sont en opéron avec *ldh* codant pour la lactate déshydrogénase, constituant l'opéron *las* (Llanos *et al.*, 1993). En effet, le gène *ldh* est indépendant chez le pneumocoque. Une caractéristique notable concernant les gènes glycolytiques de *S. pneumoniae* est l'existence de deux gènes codant pour l'activité glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénases, à savoir *gapA* et *gapN*. Par analogie avec *B. subtilis*, *gapA* code pour l'activité glycolytique NAD⁺-dépendante, et *gapN* code pour l'activité néoglucogénique NADP⁺-dépendante (Fillinger *et al.*, 2000).

II.4.2 Régulation des gènes du métabolisme carboné

A ce jour, on constate une quasi-absence de données concernant la régulation des gènes du métabolisme carboné chez *S. pneumoniae*. Toutefois, d'autres bactéries modèles comme *L. lactis* ou *B. subtilis* ont été largement étudiées, et vont me permettre de présenter dans cette partie les principaux mécanismes mis en jeu.

✓ Influence du substrat carboné sur l'expression des gènes

De nombreux travaux concernant le contrôle de l'expression des gènes du catabolisme des sucres ont été réalisés chez *L. lactis*. Ces résultats ont mis notamment en évidence une

activation de l'expression de l'opéron *las* (*pfk*, *pyk* et *ldh*) sur glucose, contrairement au galactose. De plus, l'opéron *gal* impliqué dans la métabolisation du galactose est induit sur galactose, et réprimé sur glucose ou sur un mélange glucose / galactose (Luesink *et al.*, 1998). Par ailleurs, les gènes *pfl* et *adhE* tous deux impliqués dans le métabolisme mixte sont induits sur galactose par opposition au glucose, en aérobiose ou anaérobiose (Arnau *et al.*, 1997; Arnau *et al.*, 1998). Une étude plus globale de l'expression des gènes glycolytiques a montré une activation des gènes glycolytiques sur glucose chez *L. Lactis* (Jamet, 2001). Ainsi, il semble que les gènes *glk* et *pgi* soient plus exprimés sur glucose que sur galactose, ainsi que *enoA*, *enoB* et *gapA2*, mais de façon plus atténuée. L'activation de l'opéron *las* sur glucose a également été confirmée. Par contre, l'expression de *pgk* et *pmg* est constitutive par rapport au sucre, et celle de *fba* semble faiblement réprimée sur glucose. De la même façon chez la bactérie aérobie facultative *Bacillus subtilis*, en condition d'excès de glucose, les gènes *gap* et *pgk-tpi-pgm-eno* (opéron) sont activés alors que l'expression de *pgi*, *pfk*, *fba* et *pyk* reste constitutive (Blencke *et al.*, 2003). De plus, les gènes codant pour les voies de production des acides organiques (*pta*, *ackA* et *alsS*) sont activés, ceux codant pour les enzymes du cycle de Krebs étant réprimés afin d'orienter le flux catabolique en excès vers ces mêmes acides organiques. Concernant plus particulièrement *S. pneumoniae*, une étude récente a montré la répression du gène *bgaA* codant pour la beta-galactosidase en présence de glucose (Kaufman et Yother, 2007). Pour autant, cette enzyme ne participe pas au métabolisme du lactose mais plutôt à la capacité de virulence, le lactose étant pris en charge par une 6-phospho-beta-galactosidase codée par le gène *lacG* (Zahner et Hakenbeck, 2000). Ces différentes régulations concertées des gènes du métabolisme central semblent pour la plupart assurées par la protéine régulatrice CcpA (catabolite control protein A). Cette protéine majeure du mécanisme de répression catabolique a été identifiée chez de nombreuses bactéries Gram+ (à faible contenu en G+C), dont *S. pneumoniae* sous le nom de RegM (Giammarinaro et Paton, 2002). Ainsi, cette conservation suggère une régulation du métabolisme central relativement proche chez les différentes espèces de bactéries Gram+. Le paragraphe qui suit présente le mécanisme d'action et les implications de CcpA dans la régulation de ces gènes.

✓ CcpA : un régulateur central du métabolisme carboné

La régulation du métabolisme central, et plus particulièrement du métabolisme carboné, constitue un point clé dans la capacité d'adaptabilité environnementale des bactéries,

cette régulation étant fortement sous la dépendance du mécanisme de répression catabolique (Schumacher *et al.*, 2007). Il permet en effet aux bactéries de modifier l'expression de leurs gènes cataboliques en réponse à la disponibilité des sources de carbone rapidement métabolisables, et par conséquent d'installer une certaine hiérarchie dans l'utilisation des sucres. Le glucose étant l'un des composés carbonés les plus efficaces pour la répression de la synthèse de certaines enzymes cataboliques, ce phénomène est parfois appelé « effet glucose » (Galinié *et al.*, 1998). Sont inclus dans la répression catabolique des phénomènes spécifiques de régulation, basés sur l'exclusion et l'expulsion de l'inducteur de voies métaboliques données, décrits au paragraphe II.3.1.3. Les phénomènes majeurs de répression catabolique mettent notamment en jeu le régulateur transcriptionnel CcpA, mis en évidence pour la première fois chez *B. subtilis*. CcpA appartient à la famille des répresseurs LacI / GalR, protéines possédant la capacité de fixation à l'ADN grâce à un motif hélice-tour-hélice, et ce en présence de différents effecteurs (Henkin, 1996). La protéine CcpA interagit avec une séquence pseudo-palindromique d'ADN appelée *cre* (catabolite responsive element), dont la séquence consensus chez *B. subtilis* est TGWNANCGNTNWCA (W = A ou T, N = A, T, G ou C) (Weickert et Chambliss, 1990). L'interaction entre CcpA et son site de reconnaissance s'effectue en présence d'un effecteur, la protéine HPr phosphorylée sur la sérine 46 (HPr(ser)P) (figure 11). La présence de HPr(ser)P (plutôt que HPr(his)P) est directement favorisée par la disponibilité en sucres rapidement métabolisables, permettant par ailleurs l'accumulation d'un certain nombre d'intermédiaires glycolytiques (Poncet *et al.*, 2004). En effet, il a été récemment démontré que l'interaction entre CcpA et HPr(ser)P est directement stabilisée par le fructose-1,6-diphosphate et le glucose-6-phosphate, permettant une régulation fine du contrôle de l'expression des gènes par CcpA en réponse à l'activité métabolique (Schumacher *et al.*, 2007).

Le positionnement du site *cre* au niveau de la région promotrice du gène cible va directement déterminer la nature de la régulation. En effet, il a été démontré que la présence d'un site *cre* au sein ou en aval des régions -35 et -10 du promoteur engendre une répression, alors que le positionnement en amont de la région -35 provoque une activation de l'expression du gène cible (Zomer *et al.*, 2007). Par ailleurs, une étude structurale récente a permis de mieux définir la nature de l'interaction CcpA / *cre* chez *Bacillus megaterium*. Cette étude précise notamment les bases et les acides aminés impliqués dans l'interaction (figure 12), et suggère la relative plasticité du motif hélice-tour-hélice de CcpA dans la reconnaissance du site *cre*, permettant une certaine dégénérescence de la séquence (Schumacher *et al.*, 2004).

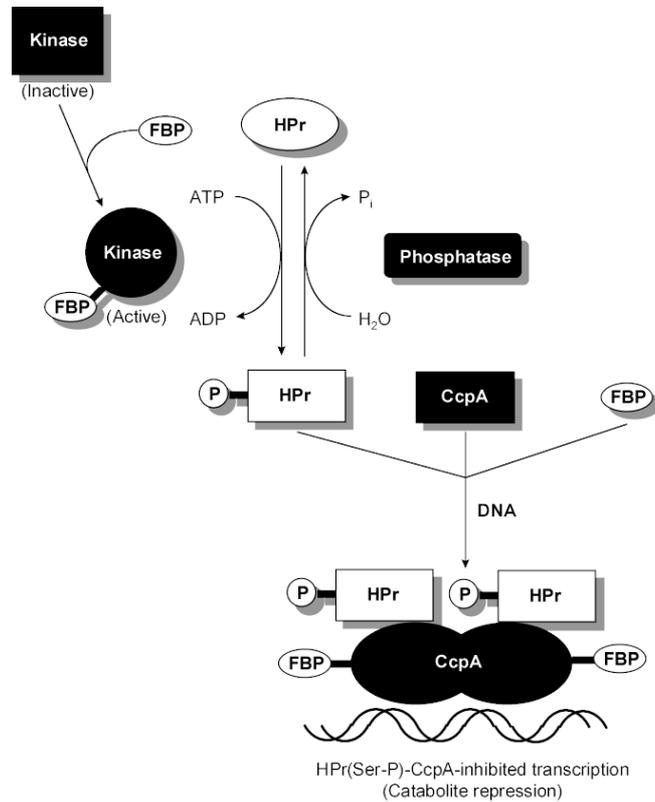


Figure 11. Le mécanisme de répression catabolique. D'après Saier *et al.*, 1996.

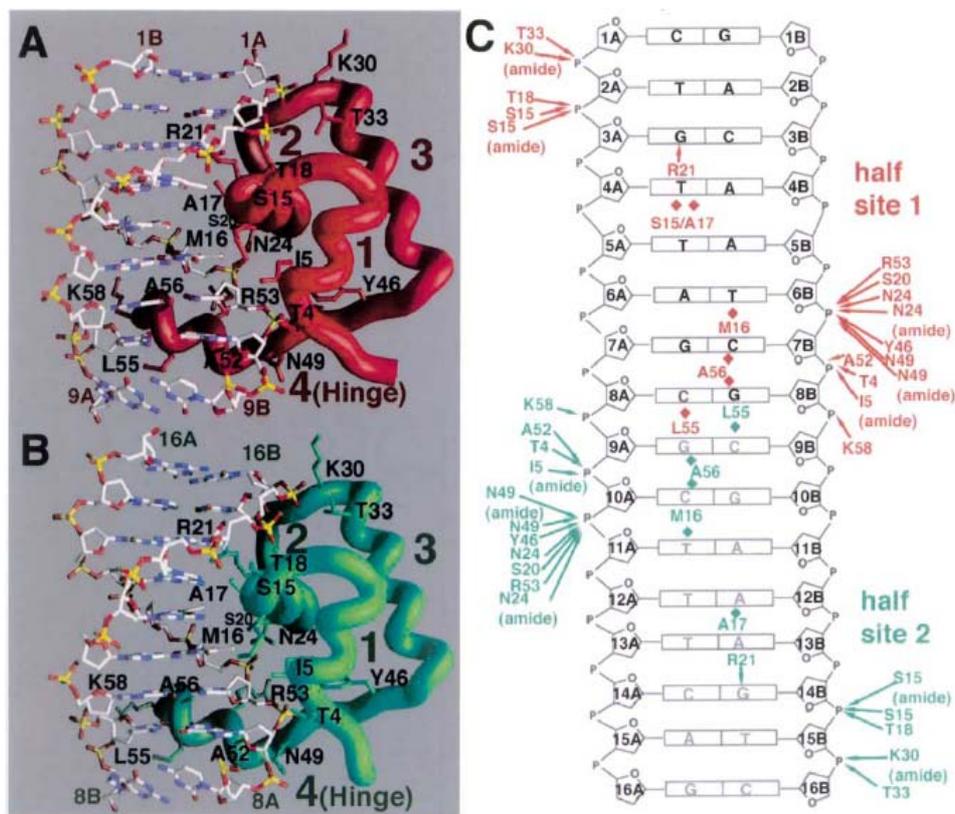


Figure 12. Interaction de CcpA avec un site *cre* chez *B. megaterium*. D'après Schumacher *et al.*, 2004. A et B : représentation tridimensionnelle de l'interaction de CcpA avec les deux demi-sites *cre* de 8 pb chacun. C : représentation schématique du contact entre CcpA et le site *cre*.

D'autres mécanismes de régulation intégrés dans la répression catabolique reposent sur le contrôle par phosphorylation d'antitermineurs transcriptionnels ou d'activateurs transcriptionnels via HPr(his)P, ou d'autres composants du système PTS comme la perméase EII^S (Deutscher *et al.*, 1997; Stulke et Hillen, 2000). L'entrée des sucres provoque la déphosphorylation de HPr(his)P et par conséquent la négation de ce contrôle positif ou négatif. Citons l'exemple chez *B. subtilis* du contrôle de LevR et LicR (activateurs transcriptionnels) ou de LicT et SacT (antitermineurs), décrit par Stulke et Hillen (2000).

Concernant les gènes cibles de la régulation CcpA-dépendante, la plupart des travaux sont basés sur l'étude de mutants du gène *ccpA*, très peu de données étant disponibles sur le métabolisme central du pneumocoque. On trouve seulement deux articles démontrant une répression des gènes codant pour l'alpha-glucosidase (catabolisme du maltose) et la beta-galactosidase (catabolisme du lactose, enzyme codée par *lacG*) en présence de glucose (Giammarinaro et Paton, 2002; Iyer *et al.*, 2005). Une troisième étude confirme la fonctionnalité d'un site *cre* répresseur pour la beta-galactosidase BgaA qui comme décrit précédemment n'est pas impliquée dans le métabolisme du lactose (Iyer *et al.*, 2005; Kaufman et Yother, 2007). Nous verrons plus loin que CcpA constitue probablement un régulateur clé du métabolisme central de *S. pneumoniae*, son rôle s'étendant au contrôle de plusieurs facteurs de virulence.

L'impact de CcpA sur le métabolisme a toutefois été assez largement étudié chez d'autres espèces comme *L. lactis*. Luesink *et al.*, (1998b) ont ainsi mis en évidence un contrôle négatif de l'expression de l'opéron *gal* par CcpA, et une activation catabolique de l'opéron *las* (*pfk-pyk-ldh*). Ces résultats ont été confirmés dans une étude récente (Zomer *et al.*, 2007), suggérant par ailleurs une régulation de CcpA dépendante de la phase croissance, en accord avec le besoin en effecteurs comme le G6P ou le FDP qui s'accumulent de façon différentielle en fonction de l'activité métabolique. D'autre part, il semble que la protéine CcpA exerce une régulation positive sur d'autres gènes glycolytiques de *L. lactis*, comme *pgi*, *gapA2*, *enoA* et *enoB*, mais qu'elle ne contrôle pas l'expression de *glk*, *fbaA*, *pgk* ou *pmg* (Jamet, 2001). Concernant le métabolisme du pyruvate, une étude récente chez *B. subtilis* a démontré une régulation positive du gène *ackA* codant pour l'acétate kinase, et ce via un mécanisme concerté entre CcpA et CodY (Shivers *et al.*, 2006). CodY est un autre régulateur transcriptionnel global, réprimant une partie du métabolisme azoté (Molle *et al.*, 2003).

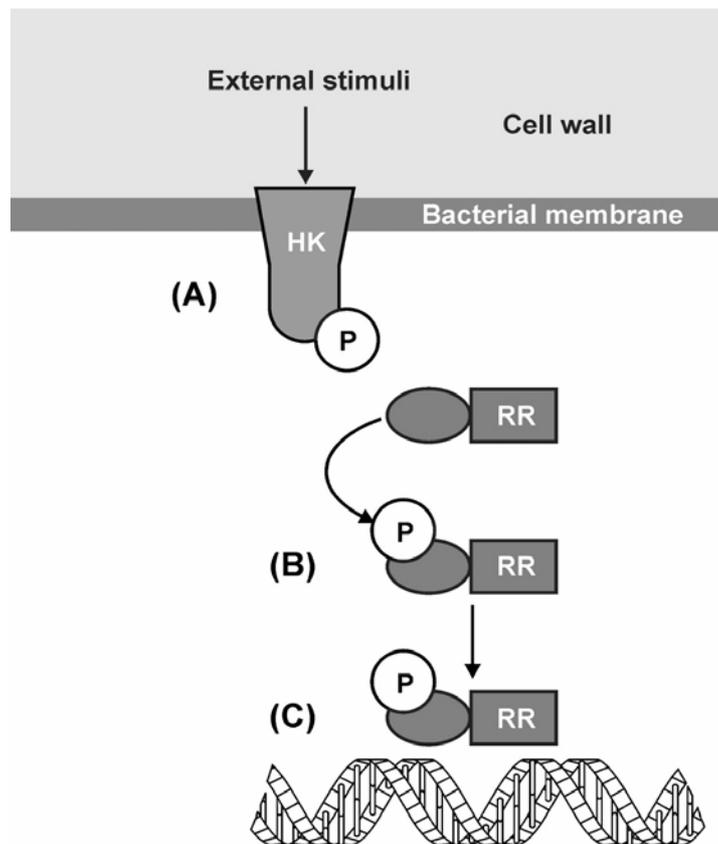


Figure 13. Représentation schématique d'un système à deux composants. D'après Paterson *et al.*, 2006. (A) Perception d'un stimulus externe provoquant l'autophosphorylation de l'histidine kinase via l'ATP intracellulaire, (B) Transfert du groupement phosphate par *hk* vers *rr*, (C) *rr* ainsi phosphaté peut jouer le rôle de régulateur transcriptionnel.

✓ Les autres régulateurs du métabolisme carboné

Au-delà de CodY déjà mentionné, il est nécessaire de noter l'existence de nombreux régulateurs transcriptionnels contrôlant l'expression des gènes codant pour l'utilisation de substrats carbonés, tels que le lactose (LacR, *spr1067*), le saccharose (ScrR, *spr1569*) le xylose (XylR, *spr0420*), le maltose (MalR, *spr1922*), le fructose (FruR, *spr0778*), ou le trehalose (TreR, *spr1700*) (Hoskins *et al.*, 2001). D'autre part, plusieurs systèmes à deux composantes (TCS) sont eux aussi impliqués dans la régulation du métabolisme carboné. Comme présenté en figure 13, ces systèmes mettent classiquement en jeu une histidine kinase (*hk*) membranaire jouant le rôle de senseur, et un régulateur cytoplasmique (*rr*) qui joue le rôle de régulateur transcriptionnel (Stock *et al.*, 2000). Classiquement, les TCS permettent aux bactéries de percevoir différents stimuli, et de s'adapter en conséquence (Paterson *et al.*, 2006). L'analyse du génome de *S. pneumoniae* a révélé l'existence de 13 systèmes à deux composantes (Lange *et al.*, 1999), CiaRH ayant été le premier identifié (Guenzi *et al.*, 1994). CiaH est une histidine kinase membranaire, et CiaR le régulateur transcriptionnel cytoplasmique qui a la capacité de se fixer sur l'ADN au niveau d'une séquence répétée TTTAAG-N₅-TTTAAG (Halfmann *et al.*, 2007). CiaRH est notamment impliqué dans le transport (*manLMN*) et l'utilisation (*manPQ*) du mannose, ainsi que dans le métabolisme du ribose (*deoAC*) (Mascher *et al.*, 2003). Le TCS2 (*vicRK*, *micAB*, *ycyFG*) est pour sa part directement impliqué dans la régulation du métabolisme des acides gras (Mohedano *et al.*, 2005), le TCS8 participant au contrôle de l'assimilation du cellobiose (McKessar et Hakenbeck, 2007). Je montrerai par la suite que ces systèmes à deux composantes sont aussi impliqués dans la régulation de certains facteurs de virulence.

II.4.3 Les gènes du métabolisme azoté

Dans ce paragraphe, je décrirai particulièrement la partie du métabolisme azoté en relation directe avec le métabolisme carboné, avec notamment la glutamine et les acides aminés branchés. En effet, la régulation des gènes impliqués dans ces voies métaboliques a été relativement bien décrite dans les bactéries modèles *L. lactis* et *B. subtilis*, mais aussi pour *S. pneumoniae*.

Table 5. Gènes codant pour les systèmes perméases identifiés chez *S. pneumoniae*, impliqués dans le transport des acides aminés. D'après Hoskins *et al.*, 2001..

Gène	Numéro d'identification	Fonction	Séquence -10
<i>glnP</i>	<i>spr0532, spr0533, spr0623, spr0624, spr0727, spr1120, spr13553</i>	ABC transporter glutamine membrane spanning permease	TATACT ou TATAAT
<i>glnQ</i>	<i>spr0408, spr0535, spr0536, spr0622, spr0728, spr1121, spr1354</i>	ABC transporter glutamine ATP binding protein	TATAAT
<i>livJHMGF</i>	<i>spr0659, spr0660, spr0661, spr0662, spr0663</i>	Branched chain amino acid ABC transporter	TATATT
<i>ABC-NDB</i>	<i>spr1314, spr1315</i>	Aspartate / glutamate ABC transporter	TAGAAT

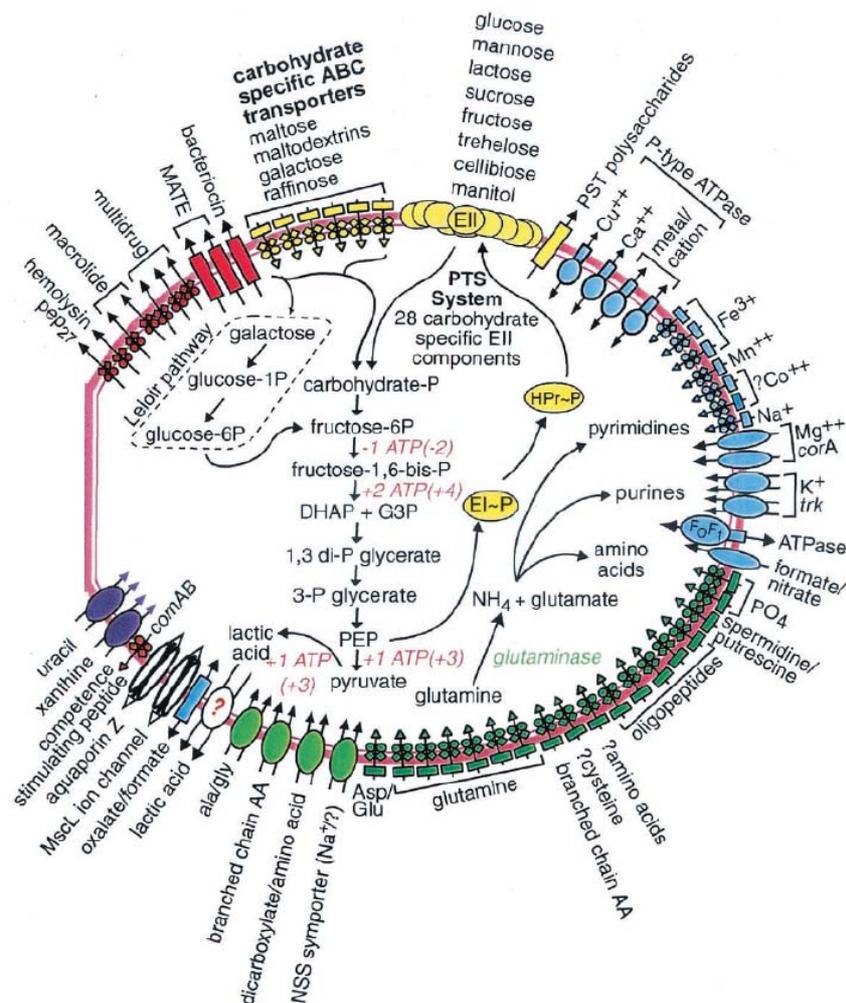


Figure 14. Représentation schématique du transport des substrats, du métabolisme du carbone et de la glutamine chez *S. pneumoniae* R6. D'après Hoskins *et al.*, 2001.

✓ Le transport des acides aminés

Le transport des acides aminés est essentiellement assuré par des systèmes de type perméase (Hoskins *et al.*, 2001). On en dénombre 7 différents qui sont attribués au transport de la glutamine, et codés par des gènes organisés en opéron, à savoir *glnP* et *glnQ*. Le transport des acides aminés branchés (leucine, isoleucine et valine) est assuré par un système perméase codé par l'opéron *liv*. Le transport de l'aspartate et du glutamate est assuré par un même transporteur codé là encore par un opéron. Les différents gènes impliqués dans ces transports sont présentés en table 5, et possèdent des séquences promotrices proches des consensus. En parallèle de ces gènes, on trouve une série de transporteurs de type perméase impliqués dans le transport des acides aminés mais sans spécificité identifiée, ainsi qu'une série de perméases impliquées dans le transport des peptides. La figure 14 résume de façon schématique l'ensemble des transporteurs identifiés chez *S. pneumoniae*, d'après le séquençage du génome (Hoskins *et al.*, 2001).

✓ Le métabolisme des acides aminés

Les principaux gènes impliqués dans le métabolisme azoté du pneumocoque sont présentés en table 6. De la même manière que les gènes du métabolisme carboné, tous ces gènes possèdent des régions promotrices proches des séquences consensus. La glutamine constitue probablement un point central de ce métabolisme, d'une part à cause de l'existence de 7 systèmes perméase potentiels, et d'autre part du fait de ses différentes connexions dans le métabolisme central. Toutefois, on ne peut exclure que certains de ces transporteurs concernent d'autres acides aminés. Rappelons que la glutamine est directement liée au métabolisme carboné, et permet d'aboutir à la synthèse des purines, des pyrimidines, ou encore des précurseurs nécessaires à la synthèse de la paroi (figure 9). La glutamine peut donc provenir du milieu extracellulaire via les différents transporteurs, mais aussi du glutamate grâce aux activités glutamate déshydrogénase et glutamine synthétase codées par les gènes *gdhA* et *glnA*, ce dernier étant en opéron avec *glnR* codant pour un répresseur transcriptionnel (cf. partie ci-après). Elle peut alors emprunter les différentes voies métaboliques suivantes :

- le métabolisme des aminosucres via l'activité D-fructose-6-phosphate amidotransférase codée par le gène *glmS*, à l'origine des unités de base nécessaires

Table 6. Les principaux gènes du métabolisme central azoté chez *S. pneumoniae*. D'après Hoskins *et al.*, 2001.

Gène	Numéro d'identification	Fonction	Séquence -10
<i>purA</i>	<i>spr0021</i>	Adenylosuccinate synthetase	TATAAT
<i>purR</i>	<i>spr1793</i>	Operon repressor PurR	TATATT
<i>purCKFMNHDEKB</i>	<i>spr0045</i> → <i>spr0056</i>	Purine metabolism	TACAAT
<i>glmS</i>	<i>spr0245</i>	D-fructose-6-phosphate amidotransferase	TATACT
<i>pyrR-pyrB-carA-carB</i>	<i>spr1156, spr1157, spr1158, spr1159</i>	Pyrimidine regulatory protein, aspartate carbamoyltransferase, carbamoyl-phosphate synthase	TATAGT
<i>pyrF-pyrE</i>	<i>spr0613, spr0614</i>	Orotidine 5'-phosphate, decarboxylase orotate phosphoribosyltransferase	TAGAAT
<i>pyrDA</i>	<i>spr0672</i>	Dihydroorotate dehydrogenase	(ext)TATAAT
<i>pyrC</i>	<i>spr1053</i>	Dihydroorotase	(ext)TATAAT
<i>glnR-glnA</i>	<i>spr0443, spr0444</i>	Transcriptional repressor of the glutamine synthetase, Glutamine synthetase	TATAAT
<i>gdhA</i>	<i>spr1181</i>	Glutamate dehydrogenase	(ext)TATAAT
<i>ilvBNC-A</i>	<i>spr0401, spr0402, spr0403, spr0406</i>	BCAA synthesis	TATGAT

à la synthèse du peptidoglycane et des acides teichoïques (N-acetyl glucosamine et N-acetyl muramique).

- *le métabolisme des pyrimidines* via l'activité des opérons *pyrR-pyrB-carA-carB*, *pyrF-pyrE*, et des gènes *pyrDA* et *pyrC*. Ces voies permettent la synthèse de l'UTP (Uridine triphosphate), du CTP (Cytidine triphosphate) et du TTP (Thymidine triphosphate). L'UTP permet avec le G1P (déviation de la glycolyse) la synthèse de l'UDP-glucose, premier précurseur de la synthèse du polysaccharide capsulaire.
- *le métabolisme des purines* via l'activité des opérons *purCKFMNHDEKB*, et des gènes *purA* et *purR*. Ces voies permettent la synthèse de l'ATP (Adenosine triphosphate) et du GTP (Guanosine triphosphate).

Concernant les acides aminés branchés, au-delà de la possibilité de les capter dans l'environnement via la perméase codée par l'opéron *liv*, *S. pneumoniae* possède l'ensemble des gènes codant pour leur synthèse avec l'opéron *ilvBNC-A*. Le flux carboné à l'origine de cette synthèse provient du pyruvate, soit là encore une connexion directe avec le métabolisme carboné. Même si je ne l'aborderai pas en détail, je tiens à préciser pour finir qu'une série de transporteurs d'oligopeptides est présente chez *S. pneumoniae*, les peptides étant généralement des sources privilégiées en azote pour les bactéries lactiques (Thompson J., 1994).

II.4.4 Régulation des gènes du métabolisme azoté

La régulation des gènes du métabolisme azoté est dépendante d'un nombre important de régulateurs transcriptionnels, qui de la même manière que CcpA répondent à des changements environnementaux. Je citerai tout d'abord CodY (*spr1439*), répresseur transcriptionnel pléiotrope particulièrement étudié chez *B. subtilis*. Plusieurs études fonctionnelles ont montré que cette protéine est capable de lier l'ADN en présence de deux effecteurs que sont le GTP et les BCAA. Le consensus établi chez *L. lactis* concernant sa séquence de fixation à l'ADN est AATTTTCWGAAAATT (den Hengst *et al.*, 2005)

Chez *B. subtilis*, CodY réprime significativement plus de 100 gènes durant la phase exponentielle de croissance, gènes impliqués dans différentes voies métaboliques et fonctions cellulaires comme l'assimilation des peptides, le développement de la compétence ou encore la synthèse des acides aminés branchés (Serror et Sonenshein, 1996). La seule exception pour laquelle CodY est connu pour être activateur concerne le gène *ackA* (acétate kinase), dont la régulation est partagée avec CcpA (paragraphe II.4.2). Cette régulation concertée n'est d'ailleurs pas le seul exemple chez *B. subtilis*, puisque l'opéron *ilv* semble soumis lui aussi à la double régulation CodY / CcpA, CcpA jouant un rôle d'activateur et CodY de répresseur (Tojo *et al.*, 2005). Un troisième régulateur TnrA participe lui aussi à cette régulation mais n'a pas été identifié chez le pneumocoque (Kloosterman *et al.*, 2006).

L'analyse du régulon CodY chez *L. lactis* montre beaucoup de similarités avec celui de *B. subtilis*, les différences étant essentiellement liées aux caractères physiologiques propres à chacune des deux bactéries. Ainsi, l'opéron *ilv* constitue là encore une cible privilégiée ainsi que le transport des peptides ou des acides aminés (den Hengst *et al.*, 2005). Une étude récente du régulon CodY de *S. pneumoniae* a confirmé la répression de l'opéron *ilv*, ainsi que *gdhA* codant pour la glutamate déshydrogénase (Hendriksen *et al.*, 2008). Il est par ailleurs suggéré que CodY serait directement ou indirectement impliqué dans la pathogénicité du pneumocoque, en accord avec son implication dans la faculté à répondre à des modifications de l'environnement nutritionnel.

Un autre répresseur transcriptionnel d'intérêt présent chez *S. pneumoniae* est GlnR, dont le gène est en opéron avec *glnA* codant pour la glutamine synthase. Ce régulateur a la propriété de réprimer son propre opéron *glnRA*, et cible par ailleurs le transport de la glutamine (*glnPQ*), la synthèse de la glutamine (*gdhA* et *glnA*) ainsi que *zwf* codant la glucose-6-phosphate déshydrogénase (première enzyme de la voie des pentoses phosphates). Ce type de régulation a été observé en présence de concentrations élevées en glutamine et en ammonium dans le milieu (Kloosterman *et al.*, 2006). Chez *B. subtilis*, GlnR réprime aussi son propre opéron *glnRA* (Brown et Sonenshein, 1996), l'opéron *ureABC* codant pour l'uréase (Fisher, 1999; Wray, Jr. *et al.*, 1997) mais aussi *tnrA* (Fisher, 1999).

Enfin, on trouve les répresseurs PurR et PyrR (table 7) qui régulent l'expression des gènes codant pour la biosynthèse des purines et des pyrimidines, préalablement identifiés chez *L. lactis* (Kilstrup et Martinussen, 1998; Martinussen *et al.*, 2001).

III. Les différents facteurs de pathogénicité de *S. pneumoniae*

Comme je viens de le présenter, *S. pneumoniae* est une bactérie lactique classique au niveau de son métabolisme central, et ce vis-à-vis de son modèle de référence *L. lactis*. Ce qui différencie le plus ces deux microorganismes est bien entendu le caractère pathogène du pneumocoque, cette bactérie étant capable de mettre en jeu un certain nombre de facteurs qui lui permettent de coloniser, puis d'envahir son hôte.

Dans cette partie, je décrirai de façon exhaustive les différents facteurs de pathogénicité mis en jeu par le pneumocoque, et en particulier le polysaccharide capsulaire qui est le point central de cet exposé. Les principaux mécanismes de régulation de ces différents facteurs seront aussi détaillés.

III.1 Le polysaccharide capsulaire : déterminant antigénique majeur

L'existence du polysaccharide capsulaire (CPS) de *S. pneumoniae* a été notifiée par Pasteur dans la première publication décrivant ce microorganisme en 1880, après quoi il a été l'objet de recherches intensives (Austrian, 1981). Les études menées durant les trois premières décennies du 20^{ème} siècle ont démontré l'existence de multiples types capsulaires de *S. pneumoniae*, et le fait que des anticorps dirigés contre un type capsulaire confèrent une protection spécifique sur des animaux de laboratoire. Dochez et Avery ont été les premiers en 1917 à isoler le matériel capsulaire, mais son caractère immunogène les portait à croire que cette « substance soluble du pneumocoque » était une protéine. Il a fallu attendre 1925 pour qu'Avery et Heidelberger démontrent que la capsule du pneumocoque était de nature polysaccharidique, soit le premier antigène connu de nature non protéique.

S.S. 38 A

W. 25. dil. HCl, made finally all. to Litmus w. NaOH, pptd. w. 20. with
 Ba(OH)₂ (Schlemmer's for analysis) soln. Let stand in ice box over night.
 Ba(OH)₂ - Centrif. repeatedly. Supernatant supernatant still +++. Red.
 of even enough Ba(OH)₂ to cover out in cooking does not ppt. all S. 23 -
 Ppt. (A) taken up in 20. cc. H₂SO₄. Supernatant B pptd. w.
 20. H₂SO₄, centrif. w. NaOH, could be digested in ice
 bath up in washings of H₂SO₄ ppt., again cent., 2nd out of
 ca. 150cc. pptd. w. 100cc. alc. MAR 22 - Supernatant discarded
 ppt. centrif. stirred w. H₂O, set in ice box. (A) repeatedly centrif.
 ppt. washed w. little dil. HCl & centrif. Soln. washed w. 20. cc. H₂O
 B lost in accident to cold centrifuge
 APR 2 - A 20. cc. + 10g. NaOAc, at vol. of 250cc. pptd. w.
 200cc. alc. Let stand in cold. APR 6 - Supernatant - must
 centrif. APR 7 - Ppt. diss. in ca. 150cc. H₂O & mill. ash pptd. by
 adding H₂SO₄ to centrality, then 4cc. more. Stirred through,
 let stand in cold. APR 8 - Centrif. APR 20 - Diss. in H₂O & 20.
 dil. NaOH, dil. to 250cc. & run through Berkefeld N. Still spales
 out, so run through Berkefeld W, now coming through practically
 clear. Spales out, so added to (A). APR 21 - Cored in ice.
 APR 22 - At vol. of ca. 150 cc., again pptd. w. H₂SO₄, considerable
 so being necessary. Centrif. Supernatant - discarded
 Ppt. taken up in dil. HCl, pptd. w. 100. cc. pptd. w. 150
 cc. alc. Let stand in cold & 2 hrs. centrif. In out.
 active centred pptd. from supernatant w. Cl₂O, added to main
 portion. Diss. in ca. 75 cc. H₂O + HCl, pptd. w. red. alc.
 Let stand 2 hrs. centrif. ppt. taken up in H₂O, pptd. w. ca.
 3 vols. red. alc. Let stand in cold, centrif. Ppt. taken
 up in H₂O, not doing this time, let stand over night. MAY 8 - 20. added
 alc. added, let stand, centrif. in cold. Repeated 7, then let stand
 again w. H₂O. MAY 8 - Centrif. ppt. taken up in H₂O, centrif. again
 after several hrs. Repeated. Ppt. again taken up in H₂O, let stand
 over night. Centrif. Repeated. Now Cl₂ Proc. so taken up 2 x in
 acetone, can filtered, washed off, air-dried in warm place, then
 in vac. over night. Yield: 2.0g.

S.S. 38 A

MAY 11 - Lot. Cal (4) + 20. cc. 8.3943 4.3904 1.0476 8.3876 8.3849
 8.2305

MAY 27 - 20. cc. dil. HCl + NaOH, made up to 30.77 cc. 1.514
 1.536

MAY 12 - ASH
 Vol. Cal + 20. cc. 8.2707 23.3910
 " " " 8.1534 23.3509
 " " " .0773 .0014

OPTICAL ROTATION
 (c) = 0 = 0 + 0.01 1.55 1.55
 $[\alpha]_D^{20} = 155 \times 2 = +310^\circ$

Microkjeldahls
 cc. N/10 HCl (10.995) 10.00 2 cc. sample
 " " NaOH (11.015) 7.16 10.00 9.95
 14.44 7.32
 7.16 2.63
 7.26 1.15
 2.48 x 2 = 4.96 mg N
 = 0.5 mg N

Amino-N (Van Slyke)
 JUN 2 - B. 76.5 24°
 Ppt. 1.69 0.23 0.20
 0.69 0.215
 .245
 $5.55 \times 1.544 \times 100 = 12.9$ mg N per 100 cc. soln.

Action of HNO₃
 JUN 1 - 2 cc. soln. + 4 cc. 30% NaNO₂ + 2.2 cc. HOAc. Let stand 0.5 hr.
 added. Cooled w. ice-H₂O, 0.8 cc. 10% N H₂SO₄ added, aspirated 1/2 hr. made up to 25 cc.
 5 cc. sample
 Red. Sugars Rq. 16.25 (iron) 16.70 Mean: 16.45
 19.30 (total) 16.25
 $3.05 \times 1.01 \times 318 \times .98 = 0.97$ mg glucose = 2.85% glucose

Rotation
 R = 2 0 = -0.01 0 + 0.01 Rq. +18.15 16.15 16.17
 $[\alpha]_D^{20} = \frac{17 + 100}{24 \times 2} = +213^\circ$

110
 17

Ash 1.8%
 $[\alpha]_D^{20} = +310^\circ$ (ass. case)
 N = 50%
 Ash-free
 NH₂ = N
 2.6%
 Ash-free

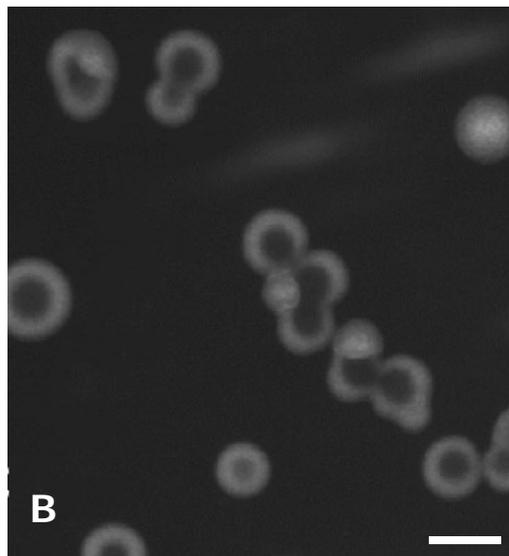
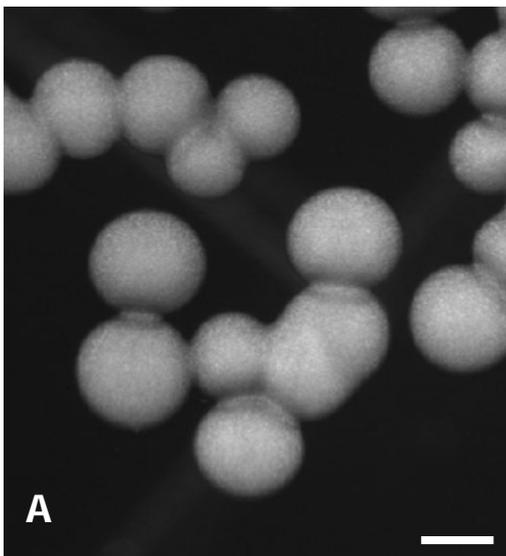


Figure 16. Vue au microscope optique des phénotypes opaques (A), et transparent (B). D'après Serrano *et al.*, 2006. Barre = 1 µm.

III.1.1 Structures et fonctions du polysaccharide capsulaire

La capsule constitue la partie externe la plus importante de la majorité des souches cliniques de *S. pneumoniae* fraîchement isolées, sa composition en sucre étant à l'origine de la définition d'un sérotype. Son épaisseur se situe classiquement entre 200 et 400 nm (Sorensen *et al.*, 1988), et à l'exception du sérotype 3, elle est attachée de façon covalente à la surface extérieure du peptidoglycane (Sorensen *et al.*, 1990). Bien que la nature de cette liaison et les enzymes impliquées ne soient pas connues, il s'agit probablement d'un système analogue à celui décrit chez *Streptococcus agalactiae*, où la capsule est liée à la paroi via un oligosaccharide supplémentaire et une liaison phosphodiester aux résidus N-acétyl-glucosamine (Deng *et al.*, 2000).

Au total, 90 types capsulaires structurellement et sérologiquement distincts ont été identifiés à ce jour (Henrichsen, 1995). Les structures polysaccharidiques les plus simples sont constituées par des polymères linéaires, comprenant au minimum 2 monosaccharides. Les structures les plus complexes sont des polysaccharides branchés, avec une « colonne vertébrale » constituée d'unités répétées comprenant 1 à 6 monosaccharides, puis des chaînes additionnelles de chaque côté du plan. Les tables 7a et 7b présentent les structures des motifs répétés des 23 sérotypes entrant dans la composition du vaccin Pneumo 23. Les caractéristiques biochimiques des 23 polysaccharides capsulaires rentrant dans la composition du vaccin pneumo-23 sont présentées dans la table 8. Il est important de noter que deux nomenclatures existent pour la classification des sérotypes : Américaine et Danoise. La nomenclature Danoise est la plus utilisée aujourd'hui, avec des numéros pour chaque sérotype, et des sous-groupes mentionnés avec des lettres (sérotype 9V par exemple).

Le polysaccharide capsulaire est la condition *sine qua non* de la virulence du pneumocoque (Austrian, 1981). Comme décrit précédemment, un isolat clinique fraîchement isolé présente toujours un phénotype capsulé, et tout dérivé non capsulé de ce même isolat deviendra systématiquement avirulent. Les travaux d'Avery et Dubos en 1931 avaient déjà montré qu'une dépolymérisation enzymatique du CPS du sérotype 3 entraînait une augmentation de la dose létale 50% d'un facteur 10^5 . Plus récemment, le même type d'observations a été obtenu pour les sérotypes 2 et 3, à l'aide de mutations sur des gènes essentiels pour la synthèse capsulaire (Magee et Yother, 2001; Morona *et al.*, 2004).

Table 7a. Structure chimique des unités répétées du polysaccharide capsulaire des sérotypes du vaccin pneumo 23 (sérotypes 1 → 12F).

Sérototype	Structure	Référence
1	→3)-D-AAT-α-Galp-(1→4)-α-D-GalpA(2/3OAc)-(1→3)-α-D-GalpA-(1→	(Stroop <i>et al.</i> , 2002)
2	→4)-β-D-Glcp-(1→3)-[α-D-GlcpA-(1→6)-α-D-Glcp-(1→2)] -α-L-Rhap-(1→3)-α-L-Rhap-(1→3)β-L-Rhap-(1→	(Jansson <i>et al.</i> , 1988)
3	→3)-β-D-GlcA-(1→4)-β-D-Glcp-(1→	(Reeves et Goebel, 1941)
4	→3)-β-D-ManpNAc-(1→3)-α-L-FucpNAc-(1→3)-α-D-GalpNAc-(1→4) -α-D-Galp _{2,3(S)} Py-(1→	(Jansson <i>et al.</i> , 1981)
5	→4)-β-D-Glcp-(1→4)-[α-L-PnepNAc-(1→2)-β-D-GlcpA-(1→3)] -α-L-FucpNAc-(1→3)-β-D-Sugp-(1→	(Jansson <i>et al.</i> , 1985)
6B	→2)-α-D-Galp-(1→3)-α-D-Glcp-(1→3)-α-L-Rhap-(1→4)-D-Rib-ol-(5→P→	(Kenne <i>et al.</i> , 1979)
7B	→6)-α-D-GlcpNAc-(1→2)-α-L-Rhap-(1→2)-β-L-Rhap-(1→4)-β-D-Glcp-(1→4)-α-D-Glcp-(1→P→ 3 ↑ 1 β-D-Ribf-(1→4)-α-L-Rhap	(Jansson <i>et al.</i> , 1991)
8	→4)-β-D-GlcpA-(1→4)-β-D-Glcp-(1→4)-α-D-Glcp-(1→4)-α-D-Galp-(1→	(Jones et Perry, 1957)
9N	→4)-α-D-GlcpA-(1→3)-α-D-Glcp-(1→3)-β-D-ManpNAc-(1→4) -β-D-Glcp-(1→4)-α-D-GlcpNAc-(1→	(Jones, 1985)
9V	→4)-α-D-GlcpA(2/3OAc)-(1→3)-α-D-Galp-(1→3)-β-D-ManpNAc(4/6OAc)-(1→4) -β-D-Glcp-(1→4)-α-D-Glcp-(1→	(Rutherford <i>et al.</i> , 1991)
10A	β-D-Galp 1 ↓ 6 →5)-β-D-Galf-(1→3)-β-D-Galp-(1→4)-β-D-GalpNAc-(1→3)-α-D-Galp-(1→2)-D-Rib-ol-(5→P→ 3 ↑ 1 β-D-Galf	(Rao <i>et al.</i> , 1966)
11A	→6)-α-D-Glcp _{2/3} Ac-(1→4)-α-D-Galp-(1→3)-β-D-Galp-(1→4)-β-D-Glcp-(1→ 4 ↑ Gro-(1→P +OAc	(Kennedy <i>et al.</i> , 1969)
12F	→4)-[α-D-Galp-(1→3)]α-L-FucpNAc-(1→3)-β-D-GlcNAc-(1→4)-[α-D-Glc-(1→2) -α-D-Glc-(1→3)]-β-D-ManNAcA-(→	(Leontein <i>et al.</i> , 1983)

Table 7b. Structure chimique des unités répétées du polysaccharide capsulaire des sérotypes du vaccin pneumo 23 (sérotypes 14 → 33F).

Sérotipe	Structure	Référence
14	$\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}[\beta\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 4)]\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow$	(Lindberg <i>et al.</i> , 1977)
15B	$\rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow$ $\begin{array}{c} 4 \\ \uparrow \\ 1 \\ \alpha\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-Galp} \\ 3 \\ \uparrow \\ \text{Cho}_{0,2}\rightarrow P \end{array}$ $+0.7 \text{ OAc}$	(Jansson <i>et al.</i> , 1987)
17F	$\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-L-Rhap}2\text{Ac}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 2)\text{-D-Ara-ol}\text{-}(1\rightarrow P\rightarrow$ $\begin{array}{c} 4 \\ \uparrow \\ 1 \\ \alpha\text{-D-Galp} \end{array}$	(Jones <i>et al.</i> , 2000)
18C	$\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}[\alpha\text{-D-Glcp}(6\text{OAc})\text{-}(1\rightarrow 2)]\text{[Gro}\text{-}(1\rightarrow P\rightarrow 3)]\text{-}\beta\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 4)$ $\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow$	(Phillips <i>et al.</i> , 1983)
19A	$\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-ManpNAc}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow P\rightarrow$ $\begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fucp}\text{-}(1\rightarrow P \\ \downarrow \\ 3 \end{array}$	(Katzenellenbogen <i>et Jennings</i> , 1983)
19F	$\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-ManpNAc}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow P\rightarrow$	(Sugawara <i>et Igarashi</i> , 1988)
20	$\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galf}5,6\text{Ac}_2\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GlcpN}$ $\begin{array}{c} 4 \\ \uparrow \\ 1 \\ \beta\text{-D-Gal} \end{array}$	(Beynon <i>et al.</i> , 1997)
22F	$\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcpA}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-L-Rhap}2\text{Ac}_{0,8}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Galf}\text{-}(1\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow$ $\begin{array}{c} 3 \\ \uparrow \\ 1 \\ \alpha\text{-D-Glcp} \end{array}$	(Skovsted <i>et al.</i> , 2007)
23F	$\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}[\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 2)]\text{-}[\text{Gro}\text{-}(2\rightarrow P\rightarrow 3)]$ $\text{-}\beta\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow$	(Richards <i>et Perry</i> , 1988)
33F	$\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galf}2\text{Ac}_{0,4}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 5)\text{-}\beta\text{-D-Galf}\text{-}(1\rightarrow$ $\begin{array}{c} 2 \\ \uparrow \\ 1 \\ \alpha\text{-D-Galp} \end{array}$	(Richards <i>et al.</i> , 1984)

Table 8. Caractéristiques biochimiques des polysaccharides capsulaires du vaccin **Pneumo 23**. Données Sanofi-Pasteur.

Sérotype	Masse molaire de l'unité répétée (Da)	Sucre caractéristique	% théorique calculé
1	624	Ac. glucuronique	62
2	960	Ac. glucuronique	20,2
3	360	Ac. glucuronique	53,9
4	847	Galactose	21,3
5	919	Ac. glucuronique	21
6B	706	Rhamnose	23,2
7F	1226	Galactose	29,4
8	684	Galactose	26,3
9N	928	Ac. glucuronique	21
9V	933	Ac. glucuronique	20,9
10A	1249	Galactose	<i>ND*</i>
11A	908	Galactose	40
12F	1115	Galactose	<i>ND*</i>
14	689	Galactose	52,2
15B	970	Galactose	<i>ND*</i>
17F	1202	Rhamnose	<i>ND*</i>
18C	1012	Rhamnose	16,2
19A	613	Rhamnose	26,7
19F	613	Rhamnose	26,7
20	1199	Galactose	30
22F	1018	Ac. glucuronique	19,1
23F	792	Rhamnose	41,4
33F	1014	Galactose	88,8

* non disponible.

Par ailleurs, il existe une importante différence morphologique entre souches capsulées et non capsulées. Les souches capsulées sont dites opaques (lisses), alors que les non capsulées (ou faiblement) sont dites transparentes (rugueuses) (figure 16). Le mécanisme de transition entre ces deux phénotypes est nommé « variation de phase », mécanisme sur lequel je reviendrai plus loin. Toutefois, on peut d'ores et déjà noter que la phase de colonisation au niveau du nasopharynx est associée au phénotype transparent, alors que la phase d'infection (tissus et sang) est associée au phénotype opaque (Kim et Weiser, 1998). Cette forte différence morphologique associée à une importante différence de virulence a permis à Frederick Griffith de mettre en évidence le phénomène de transformation capsulaire. Il a notamment montré que l'injection d'un mélange de bactéries rugueuses vivantes / bactéries lisses mortes, provoquait la mort d'une proportion de souris, suggérant un mécanisme de transformation. Ces résultats ont amené Avery, 15 ans plus tard, à la découverte de l'ADN comme support de l'hérédité.

La manière précise avec laquelle la capsule du pneumocoque contribue à la virulence n'est pas totalement comprise à ce jour, bien qu'il soit désormais établi qu'elle confère une forte propriété antiphagocytaire dans l'hôte. Le fait que la majorité des polysaccharides capsulaires soient fortement chargés au pH physiologique serait d'ailleurs un des principaux facteurs d'interaction avec les macrophages (Lee *et al.*, 2001). La capsule forme aussi une barrière inerte contre la réponse immunitaire, permettant une protection contre les immunoglobulines G (anticorps) et la protéine du complément iC3b, qui interagissent avec les macrophages (Musher, 1992). De plus, la capsule permettrait de réduire la quantité totale de complément déposé sur la surface des bactéries (Abeyta *et al.*, 2003; Musher, 1992). Cependant, le polysaccharide capsulaire semble jouer un rôle bien avant la phase d'infection, puisque qu'il a été démontré comme étant nécessaire à la phase de colonisation (Magee et Yother, 2001).

La capacité de résistance à la phagocytose *in vitro* a été démontrée comme étant variable selon le sérotype, en accord avec le fait que certains d'entre eux sont plus invasifs que d'autres chez l'homme (Austrian, 1981). D'autre part, une souche isogénique exprimant différents types capsulaires (générés par transformations) présente des niveaux de virulence variables (Kelly *et al.*, 1994). Ainsi, la différence de virulence entre deux sérotypes de *S. pneumoniae* est clairement dépendante de la nature biologique du polysaccharide capsulaire lui-même, et non pas simplement de l'épaisseur de la capsule.

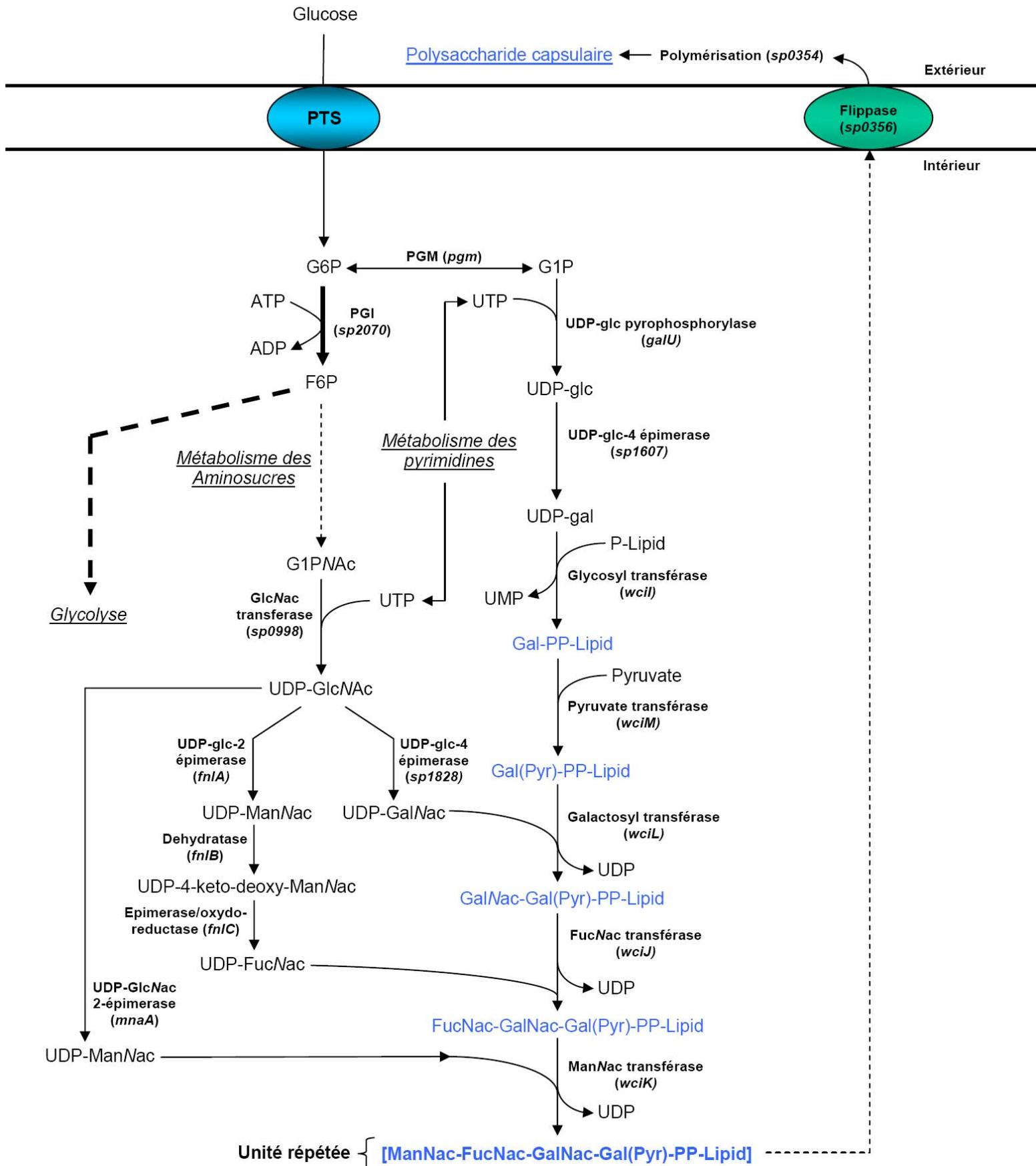


Figure 17. Représentation schématique de la voie de synthèse du polysaccharide capsulaire du sérotype 4 de *S. pneumoniae*. En bleu, l'assemblage de l'unité répétée du CPS, entre parenthèses le nom des ORFs codant pour les enzymes du sérotype 4.

En effet, les sérotypes 3 et 37 sont connus pour être producteurs d'une capsule très épaisse, mais seulement le premier est connu pour être hautement virulent chez l'homme (Austrian *et al.*, 1959).

III.1.2 Le mécanisme de synthèse du polysaccharide capsulaire

Avant d'aborder en détail les aspects génétiques, je décrirai dans cette partie le contexte métabolique dans lequel s'effectue la synthèse du polysaccharide capsulaire. Nous prendrons pour exemple une voie de synthèse « standard » (celle du sérotype 4, une des souches entièrement séquencée), représentant la grande majorité des sérotypes, pour revenir ensuite sur les exceptions.

Comme son nom l'indique, le polysaccharide capsulaire est un polymère de sucres dont la voie de synthèse est, par conséquent, en connexion directe avec le métabolisme carboné. Comme présenté en figure 17, le point de départ de cette voie de synthèse s'effectue par une déviation du flux glycolytique au niveau du glucose-6-phosphate (G6P), converti en glucose-1-phosphate (G1P) via l'activité phosphoglucomutase (nous verrons par la suite que cette enzyme constitue un point clé dans la régulation de cette voie). L'étape suivante correspond à la synthèse du premier précurseur de la voie métabolique, à savoir l'UDP-glucose, se trouvant à la jonction du métabolisme carboné (glycolyse fournissant le G1P), et du métabolisme azoté (métabolisme des pyrimidines fournissant l'UTP). Cette réaction est catalysée par la G1P uridylyltransférase. Ces deux premières réactions sont communes à la majorité des bactéries lactiques produisant des polysaccharides capsulaires, comme *S. thermophilus* ou certaines souches de *L. lactis* (De Vuyst et Degeest, 1999), mais aussi à l'ensemble des sérotypes de *S. pneumoniae* (Lopez, 2006). Les étapes suivantes sont spécifiques de la nature du polysaccharide synthétisé (sérotypes dépendante pour *S. pneumoniae*), en fonction des gènes présents sur le locus capsulaire (voir ci-après). Il s'agit généralement de plusieurs étapes de glycosylation codées par les gènes de l'opéron capsulaire, chaque sucre ajouté provenant en partie d'activités enzymatiques qui elles aussi sont portées par l'opéron (les précurseurs proviennent pour l'essentiel du métabolisme des aminosucres, figure 17). Sauf exceptions, la synthèse de la majorité des unités répétées s'effectue sur un lipide porteur, favorisant leur export à travers la membrane plasmique, pour être ensuite polymérisées et former le polysaccharide capsulaire (figure 17).

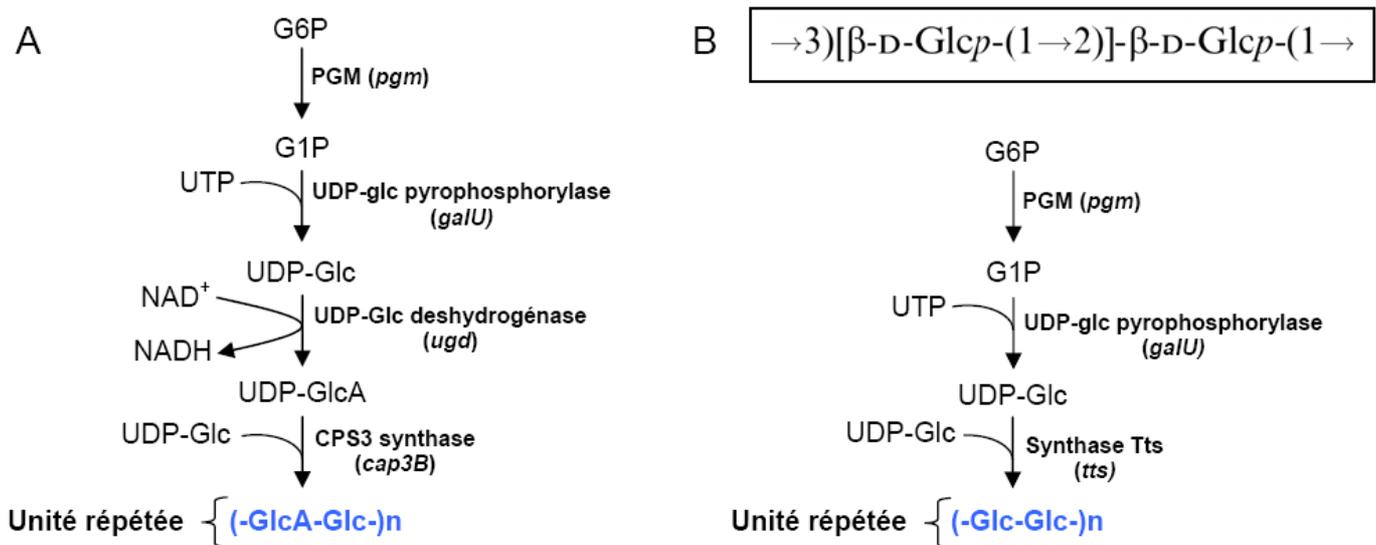


Figure 18. Schéma simplifié de la voie de synthèse du polysaccharide capsulaire du sérotype 3 (A), et du sérotype 37 (B) de *S. pneumoniae*. D'après Dillard et Yother, 1994, et Llull, 2001. L'unité répétée est en bleu.

Ce lipide porteur est de type undecaprenyl phosphate (Morona *et al.*, 2000). L'export et la polymérisation des unités répétées sont assurés par deux protéines membranaires (fortement hydrophobes), codées par des gènes présents sur le locus capsulaire (Jiang *et al.*, 2001). Deux exceptions notables concernent les sérotypes 3 et 37, pour lesquels les mécanismes de synthèse du polysaccharide capsulaire sont simplifiés, et ce en lien direct avec des locus capsulaires originaux. Le mécanisme de synthèse de l'unité répétée du sérotype 3 se limite aux deux premières réactions communes à l'ensemble des sérotypes, donnant l'UDP-glucose, suivi seulement par deux réactions spécifiques (figure 18A) (Dillard et Yother, 1994). La première est une déshydrogénation permettant la formation d'UDP-Ac. Glucuronique. La deuxième assure l'assemblage et la polymérisation du polysaccharide capsulaire via une activité synthase membranaire (Arrecubieta *et al.*, 1996). L'export s'effectue probablement selon un mécanisme analogue à *Salmonella enterica* (Keenleyside et Whitfield, 1996). Concernant le sérotype 37, il s'agit d'un mécanisme de synthèse encore plus simple, en accord avec une structure homopolysaccharidique (figure 18B). Toujours à partir de l'UDP-glucose, une unique enzyme membranaire, Tts, assure la synthèse de l'unité répétée. L'export, est probablement réalisé lui aussi par la protéine Tts, le mécanisme de polymérisation n'ayant pas encore été mis en évidence (Llull *et al.*, 2001). Par ailleurs, la synthèse du polysaccharide capsulaire de ces deux sérotypes ne nécessite pas de lipide porteur (Jiang *et al.*, 2001; Llull *et al.*, 2001).

III.1.3 Aspects génétiques de la synthèse du polysaccharide capsulaire

Après plus de 50 ans de recherches et d'avancées technologiques basées sur les travaux de Griffith et Avery, il est désormais bien établi que l'ensemble des gènes codant pour la synthèse du polysaccharide capsulaire de *S. pneumoniae* sont organisés sous forme de structures opéroniques (Austrian *et al.*, 1959), sauf exceptions sur lesquelles nous reviendrons. Durant les vingt dernières années, les travaux de nombreuses équipes ont permis de séquencer et d'annoter environ 20% de l'ensemble des locus capsulaires. Depuis peu, l'ensemble des séquences des opérons capsulaires de *S. pneumoniae* (et leur annotation) est disponible grâce à l'Institut Sanger, constituant une base de travail essentielle pour la compréhension de leurs mécanismes de fonctionnement (Bentley *et al.*, 2006).

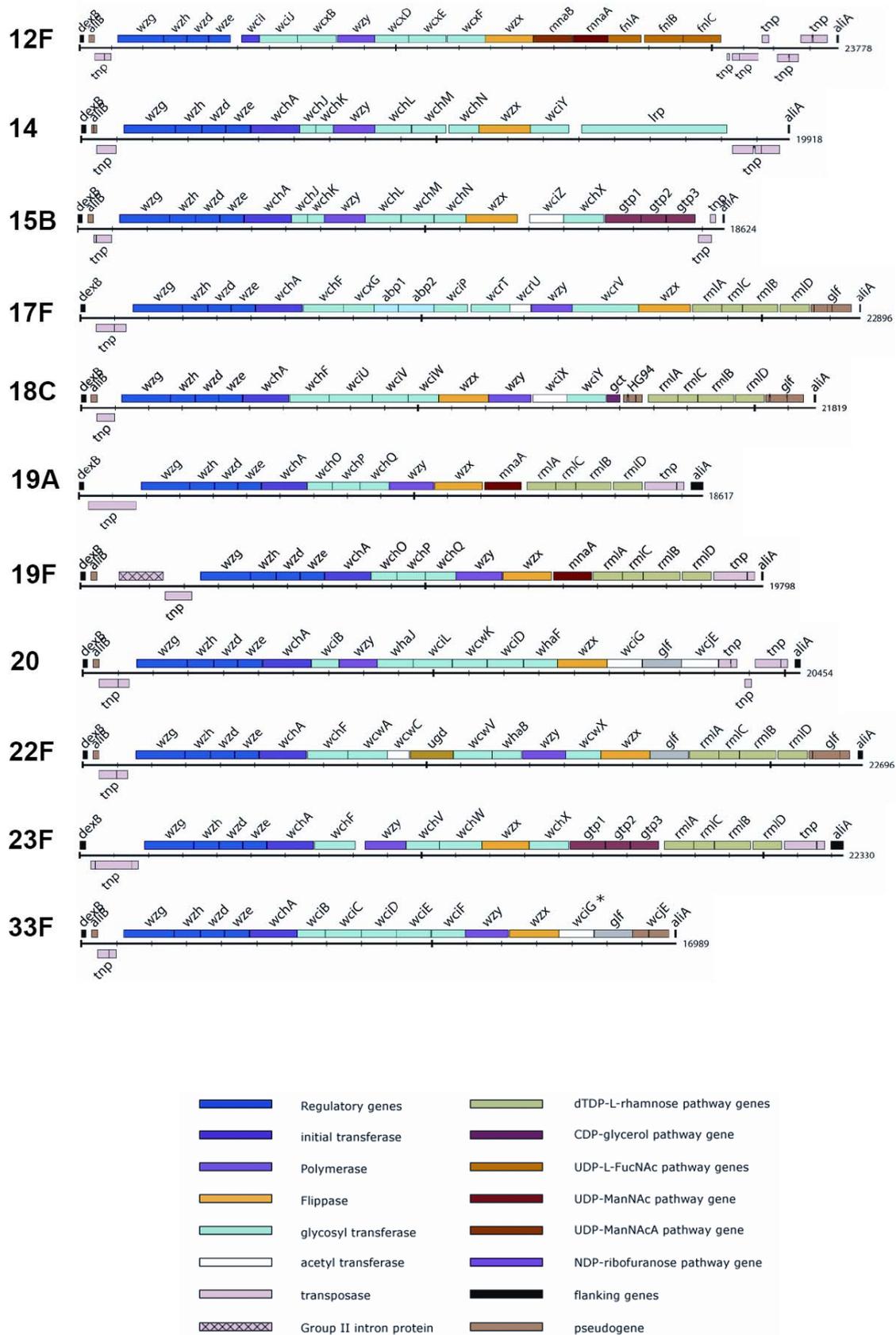


Figure 19b. Représentation schématique des opérons capsulaires des sérotypes du vaccin Pneumo 23 (sérotipe 12F → sérotipe 33F). D'après Bentley *et al.*, 2006.

Dans cette partie, je décrirai tout d'abord les différentes familles d'opérons capsulaires, puis je détaillerai les principaux mécanismes de régulation mis en évidence au niveau génétique.

III.1.3.1 Les différents types d'opérons capsulaires de *S. pneumoniae*

Le séquençage des opérons capsulaires a mis en évidence une localisation commune du locus capsulaire sur le chromosome pour l'ensemble des sérotypes de *S. pneumoniae*, entre les gènes *dexB* et *aliA* (figure 19a et 19b). Seul le sérotype 37 déroge à cette règle. En effet, ce dernier possède un locus capsulaire dégénéré entre *dexB* et *aliA* dont la synthèse capsulaire est indépendante. La synthèse capsulaire est assurée par un seul gène, *tts*, situé plus loin dans le chromosome et codant pour la synthase Tts (figure 20) (Llull *et al.*, 1999).

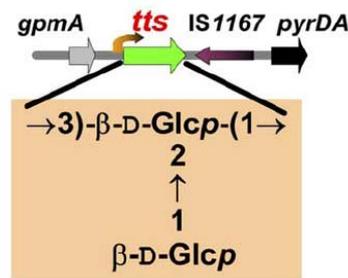


Figure 20. Représentation schématique du locus capsulaire du type 37. D'après Lopez et Garcia, 2004. En vert le gène *tts*, la flèche orange indique le promoteur du gène.

Le seul autre locus atypique est celui du sérotype 3 (figure 19a), possédant seulement trois gènes intacts (Arrecubieta *et al.*, 1996). Le premier gène *ugd* code pour l'activité UDP-glc déshydrogénase, le deuxième *cap3b* (aussi nommé *wchE*) codant pour la synthase processive qui assure à elle seule la synthèse et la polymérisation. Le dernier gène code pour une activité G1P uridyltransférase mais ne se révèle pas indispensable à la synthèse capsulaire, cette activité étant codée par le gène *galU* ailleurs dans le chromosome (Mollerach *et al.*, 1998). Comme présenté en figure 19a et 19b, la majorité des locus capsulaires ont des structures plus complexes que celles observées pour les sérotypes 3 et 37, impliquant des mécanismes de synthèse plus élaborés (cf. partie précédente). La taille des différents locus varie de 13 à 30 kb, avec un nombre de gènes variant de 10 à plus de 20, mais il existe toujours une seule unité transcriptionnelle. La fonction de ces gènes a été déterminée sur la

base d'homologies avec des protéines connues, et en rapport avec la composition chimique des unités répétées de chaque sérotype. Les quatre premiers gènes ont tous été définis comme des gènes de régulation de la synthèse capsulaire, et sont fortement conservés chez tous les sérotypes (Bender et Yother, 2001). Le premier gène *cpsA / wzg* est classiquement défini comme un régulateur transcriptionnel. *cpsB / wzh*, *cpsC / wzd* et *cpsD / wze* sont quant à eux impliqués dans un système de phosphorégulation sur Tyrosine largement étudié dans diverses bactéries, avec un modulateur membranaire (CpsC), une Tyr kinase (CpsD) et une P-Tyr phosphatase (CpsB). Par ce biais, CpsC et CpsD joueraient un rôle direct ou indirect dans la régulation de la taille et de l'export du polysaccharide capsulaire. En effet, les Tyr kinase s'autophosphorylent sur plusieurs résidus Tyr situés dans la partie C-terminale, mais phosphorylent aussi d'autres protéines comme les UDP-deshydrogénase ou certaines glycosyltransférases (impliquées dans la synthèse du polysaccharide capsulaire) de *E. coli*. Ainsi, la phosphorylation de ces protéines pourrait constituer un point de contrôle de la production capsulaire (Grangeasse *et al.*, 2006). Ce mécanisme fait actuellement l'objet d'un débat assez « virulent » autour de l'effet positif ou négatif de la phosphorylation de CpsD sur la synthèse capsulaire de *S. pneumoniae* (Morona *et al.*, 2003). La partie centrale des locus capsulaires contient les gènes codant pour différentes glycosyltransférases permettant l'assemblage de l'unité répétée, ainsi que les gènes de la flippase (*wzx*) et de la polymérase (*wzy*) qui assurent l'export et la polymérisation. La région 3' contient enfin des gènes codant pour la synthèse des monosaccharides spécifiques à chaque sérotypes.

III.1.3.2 L'évolution sérotypique

L'existence d'une importante modularité structurelle pour l'ensemble des locus capsulaires de *S. pneumoniae*, et ce dans le contexte d'une bactérie naturellement compétente, facilite grandement les échanges de gènes capsulaires spécifiques par recombinaison homologue (Coffey *et al.*, 1998). Ainsi, un sérotype peut être remplacé par un autre sérotype à une fréquence non négligeable, plus particulièrement si une forte pression de sélection immune (vaccinale ou naturelle) est exercée. En conséquence, les vaccins conjugués dont la couverture sérotypique est relativement limitée risquent à moyen terme de voir leur efficacité réduite, du fait du remplacement d'un certain nombre de sérotypes par d'autres (Veenhoven *et al.*, 2003). Cette observation permet de comprendre, d'une part, que les vaccins conjugués du

futur verront le nombre de sérotypes couverts augmenter, et d'autre part que le vaccin Pneumo 23 conserve une réalité économique en tant que relais des vaccins pédiatriques.

III.1.4 Les mécanismes de régulation de la synthèse capsulaire

Comme je viens de le montrer dans les paragraphes précédents, la synthèse capsulaire ne se résume pas à un locus capsulaire codant pour des activités enzymatiques, mais aussi à un métabolisme précis, à la jonction de différentes voies primordiales pour *S. pneumoniae*. Nous verrons donc dans cette partie quels mécanismes entrent en jeu dans la régulation des gènes capsulaires, mais aussi au niveau des différentes voies métaboliques permettant la synthèse.

✓ CcpA : un régulateur clé pour le locus capsulaire ?

Comme présenté dans le paragraphe II.4.2, CcpA constitue probablement un des régulateurs clé du métabolisme central de *S. pneumoniae*, et plus particulièrement pour le métabolisme carboné. Il n'est donc pas étonnant d'observer depuis peu des études concernant l'impact potentiel de CcpA dans la virulence. La première étude ayant permis de caractériser CcpA chez *S. pneumoniae* a montré d'une part, qu'un mutant *ccpA* de la souche pathogène D39 (sérotipe 2) n'entraînait pas de mortalité chez la souris, et d'autre part une chute de l'expression des gènes capsulaires (fusions avec le gène *lacZ*) dans ce même mutant en présence de glucose ou de saccharose (Giammarinaro et Paton, 2002). Une étude plus récente a montré pour sa part qu'un mutant *ccpA* de la souche TIGR4 perd sa capacité de colonisation du nasopharynx et des poumons, vis-à-vis de la souche sauvage (Iyer *et al.*, 2005). Même si aucun site *cre* n'a été clairement identifié à ce jour, ces études suggèrent un lien entre le métabolisme et la virulence via CcpA. Cette hypothèse est renforcée par le fait que d'autres espèces similaires semblent adopter des stratégies équivalentes pour la régulation de leur synthèse capsulaire. On peut prendre à titre d'exemple *Streptococcus mutans*, espèce relativement proche de *S. pneumoniae*, pour laquelle la mutation de *ccpA* provoque une chute d'expression d'un facteur 5 à 10 des gènes impliqués dans la synthèse de la capsule (Browngardt *et al.*, 2004). CcpA semble donc, d'après les données disponibles, un régulateur important pour la synthèse capsulaire, bien que son rôle n'ait pas encore été relié directement à l'activité métabolique de *S. pneumoniae*. Ainsi, le pléiotropisme de ce régulateur semble

aller au-delà du contrôle du métabolisme central du pneumocoque. Comme je le présenterai plus loin dans cet exposé, une partie de mon travail s'est focalisée sur la mise en évidence du rôle de CcpA dans le contrôle de la virulence du pneumocoque.

✓ Disponibilité en précurseurs : le rôle de la Phosphoglucomutase et de la G1P uridylyltransférase

Ces deux enzymes impliquées dans le métabolisme carboné sont à l'origine de la synthèse de l'UDP-glucose, premier précurseur nécessaire à la synthèse du polysaccharide capsulaire pour les 90 sérotypes de *S. pneumoniae*. Je rappellerai que la phosphoglucomutase catalyse la conversion du G6P (glycolyse) en G1P, et que la G1P uridylyltransférase permet la formation d'UDP-glucose à partir du G1P et de l'UTP (métabolisme des nucléotides). Ces deux enzymes constituent des points clé pour la synthèse capsulaire du pneumocoque, la mutation respective de chacun des gènes codant pour ces enzymes (*pgm* et *galU*) donnant des phénotypes très faiblement capsulés vis-à-vis des souches sauvages, ainsi qu'une croissance altérée (Hardy *et al.*, 2001; Mollerach *et al.*, 1998). En conséquence, ces mutants présentent aussi une virulence fortement réduite dans des modèles murins (Hardy *et al.*, 2001). De plus, une étude récente a montré que le niveau intracellulaire d'UDP-glucose serait un modulateur direct de la longueur des chaînes de polysaccharide capsulaire de *S. pneumoniae* (Ventura *et al.*, 2006). Vis-à-vis du niveau d'expression des gènes capsulaires, le pneumocoque semble donc capable de contrôler indirectement sa synthèse capsulaire via des systèmes alternatifs, comme la disponibilité en précurseurs. Une communication récente va elle aussi dans ce sens, en montrant qu'un phénotype fortement capsulé est directement associé à un niveau d'expression élevé des gènes impliqués dans la formation de l'UTP chez *S. pneumoniae* (Stroeher et Paton, 2007).

✓ L'oxygène : un paramètre environnemental important

La variabilité phénotypique observée entre la phase de colonisation (phénotype transparent faiblement capsulé) et la phase d'infection (phénotype opaque capsulé) est liée à l'adaptabilité environnementale du pneumocoque (Kim et Weiser, 1998). Au-delà de la disponibilité nutritionnelle qui doit probablement jouer un rôle fondamental dans cette transition, l'oxygène constitue lui aussi un facteur non négligeable de régulation de la synthèse capsulaire. La colonisation des voies aériennes nécessite une tolérance à l'oxygène,

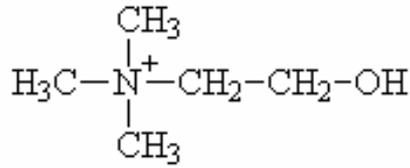


Figure 21. Structure chimique de la choline.

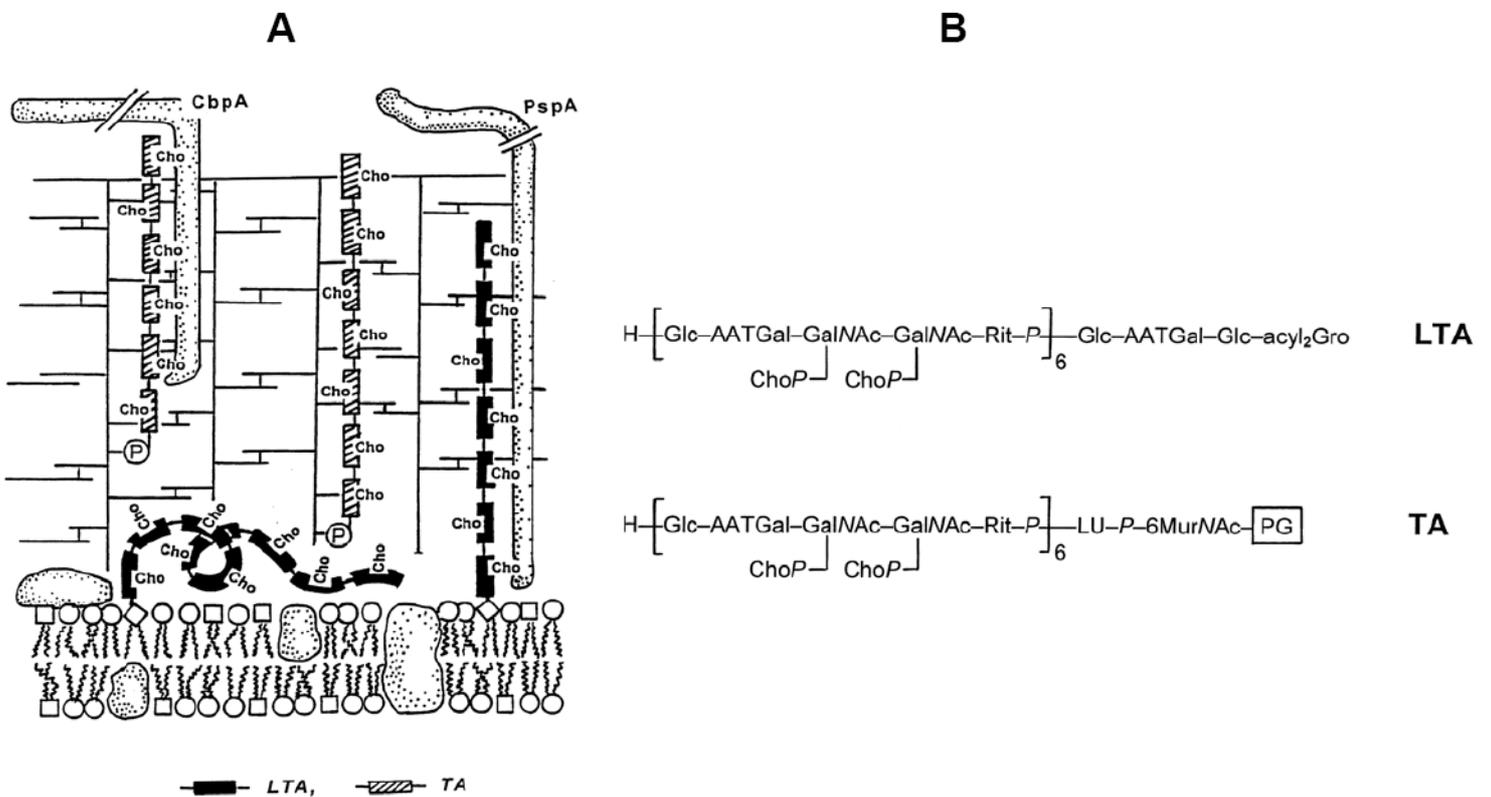


Figure 22. Représentation schématique du complexe paroi membrane de *S. pneumoniae* (A), et de la structure chimique des acides teichoïques (TA) et lipoteichoïques (LTA). D'après Fischer, 2000. Les protéines de surface CbpA (choline binding protein A) et PspA (pneumococcal surface protein A) sont aussi représentées.

or *S. pneumoniae* est une bactérie anaérobie facultative ne possédant pas de métabolisme respiratoire. Ainsi, l'oxygène peut seulement être pris en charge par les activités enzymatiques pyruvate et NADH oxydase (paragraphe II.3.1.4). Ce n'est plus le cas lors d'une infection systémique, car le sang constitue une niche dans laquelle l'oxygène est fixé par l'hémoglobine. Il a été démontré que des conditions de microaérophilie sont suffisantes pour observer une augmentation de la quantité de polysaccharide capsulaire, vis-à-vis de croissances réalisées en atmosphère normale pour *S. pneumoniae*. Ce shift est d'autant plus important lorsque les croissances sont effectuées en anaérobiose stricte (Weiser *et al.*, 2001). Dans ce même article, la variabilité de synthèse capsulaire a été associée à la variabilité d'expression de la protéine CpsD (protéine régulatrice codée par l'opéron capsulaire).

Je reviendrai plus précisément sur ce point dans la partie conclusion et perspectives, en montrant qu'au-delà d'un simple aspect génétique, la présence d'oxygène a probablement tendance à déstabiliser le métabolisme central de *S. pneumoniae*, à l'origine du phénotype transparent.

III.2 La choline : exigence nutritionnelle et rôle dans la pathogénicité

Une des propriétés uniques de *S. pneumoniae* est l'existence d'une auxotrophie pour la choline, un amino-alcool (figure 21) qu'on retrouve majoritairement dans la membrane des cellules eucaryotes sous forme de phosphatidylcholine (Weiser *et al.*, 1997). Il s'agit d'une des premières caractéristiques mise en évidence chez le pneumocoque, cette auxotrophie ayant été démontrée dès 1940 (Rane et Subbarow, 1940). La bactérie étant incapable de la synthétiser, la choline est captée directement dans l'environnement puis métabolisée pour être incorporée dans les acides teichoïques (TA) et lipoteichoïques (LTA) (Tomasz, 1967).

Des essais *in vitro* ont montré qu'une concentration en choline de l'ordre de 0.05 g/l est nécessaire pour obtenir une croissance non limitante, pour une souche de *S. pneumoniae* (Yother *et al.*, 1998).

Après avoir présenté les aspects structurels, je m'intéresserai à l'implication de la choline dans la virulence et la croissance du pneumocoque, pour terminer sur les aspects génétiques.

III.2.1 Choline et acides teichoïques

Le complexe paroi-membrane de *S. pneumoniae* présenté en figure 22A permet de voir la localisation des acides teichoïques et lipoteichoïques, les premiers étant liés par des liaisons phosphodiester au peptidoglycane, les autres par interactions hydrophobes avec la membrane plasmique (Fischer, 2000). Une des caractéristiques du pneumocoque est de présenter des structures similaires pour les TA et LTA, substitués avec des résidus phosphocholine (figure 22B) (Behr *et al.*, 1992). Les unités répétées (6 en moyenne) sont constituées par des tetrasaccharides reliés entre eux par des liaisons phosphodiester, les résidus phosphocholine étant liés aux résidus N-acétyl galactosamine de l'unité répétée. Ces deux polysaccharides de surface sont communs à l'ensemble des sérotypes de *S. pneumoniae*, et possèdent une fonction antigénique (Sorensen et Henrichsen, 1987). Toutefois, une certaine variabilité existe aussi pour ces structures, comme par exemple l'unité répétée du sérotype 5 (cf. matériel et méthode, paragraphe III.4.3), ou encore la présence de choline dans les TA qui peut présenter une seule substitution dans certains cas (Karlsson *et al.*, 1999). Il est à noter que la synthèse des précurseurs de la voie des TA et LTA est, comme présenté précédemment (figure 6, paragraphe II.3.1.2), commune avec celle du peptidoglycane. Un deuxième point de convergence de ces deux voies de synthèse se situe au niveau du lipide porteur, permettant l'export de ces éléments à travers la membrane (Fischer, 1984). Enfin, il faut préciser que les TA et LTA sont impliqués dans le mécanisme de variation de phase (Kim et Weiser, 1998).

III.2.2 Choline, croissance et virulence

De récents travaux réalisés sur des double mutants, indépendants à la choline d'une part, et incapables de l'assimiler d'autre part, ont clairement montré une implication de celle-ci dans la croissance et la virulence du pneumocoque (Kharat et Tomasz, 2006). Bien que la choline soit un facteur de croissance essentiel, elle peut cependant être substituée in-vitro par un amino-alcool, l'éthanolamine, qui s'incorpore dans la même position que la choline dans les TA et LTA. Toutefois, même si un analogue peut satisfaire la carence nutritionnelle, l'absence de résidus choline se traduit par divers phénomènes : inhibition du mécanisme d'autolyse et de la compétence, formation de longues chaînes due au blocage de la séparation des cellules au moment de la division cellulaire (Tomasz, 1967). *In vivo*, cela se traduit par

une incapacité d'adhérence au nasopharynx, et une très forte réduction de la capacité de virulence (Kharat et Tomasz, 2006). Le caractère irremplaçable de la choline dans la capacité de virulence s'explique par sa fonction de ligand pour plusieurs protéines de surface, les CBPs (choline binding proteins) impliquées dans un nombre important de fonctions physiologiques. La première ayant été identifiée est LytA, autolysine majeure du pneumocoque, impliquée notamment dans la séparation des cellules filles (Garcia *et al.*, 1986). On trouve par ailleurs d'autres hydrolases de paroi comme LytB, LytC, ou encore des protéines de surface impliquées dans l'adhésion comme PcpA, PspA ou CbpA sur lesquelles je reviendrai par la suite (Gosink *et al.*, 2000). La nécessité pour le pneumocoque de disposer de choline, à la fois pour sa croissance et sa virulence, implique une disponibilité de celle-ci au cours des processus de colonisation et d'infection dans l'hôte. Comme je l'ai déjà indiqué, la choline est essentiellement présente dans les membranes des cellules eucaryotes. *S. pneumoniae* est donc capable de mettre en place des mécanismes lui permettant de récupérer celle-ci, en particulier au niveau des épithéliums qu'elle colonise (nasopharynx, poumons). Une telle activité n'a encore jamais été démontrée chez *S. pneumoniae*, mais elle existe chez *H. influenzae*, colonisateur des mêmes niches écologiques. Cette dernière est en effet capable d'utiliser les résidus glycerophosphorylcholine présents sur l'épithélium de l'hôte, et de les convertir en choline libre, via une activité glycerophosphodiester phosphodiesterase (codée par le gène *glpQ*). La disponibilité en choline pourrait donc provenir en partie d'une activité commensale de *H. influenzae*. Par ailleurs, le pneumocoque possède une activité de type phosphorylcholine estérase qui pourrait jouer un rôle en ce sens, comme je le présenterai plus loin. Je noterai pour finir que la quantité en choline présente dans le plasma sanguin est de l'ordre de 10 μM , soit à priori en deçà de la concentration minimale requise pour une croissance non limitante (Zeisel, 2000).

III.2.3 Choline : aspects génétiques

L'ensemble des gènes impliqués dans le métabolisme de la choline sont situés au niveau du locus *lic*, lui-même organisé en deux opérons adjacents *lic1* et *lic2*, transcrits via des promoteurs divergents (figure 23). Le transport et la modification de la choline sont assurés par des protéines codées par les gènes *licA*, *licB* et *licC*, dont les fonctions ont été établies par homologie avec *H. influenzae*. Ainsi, LicA est une choline kinase, LicB un

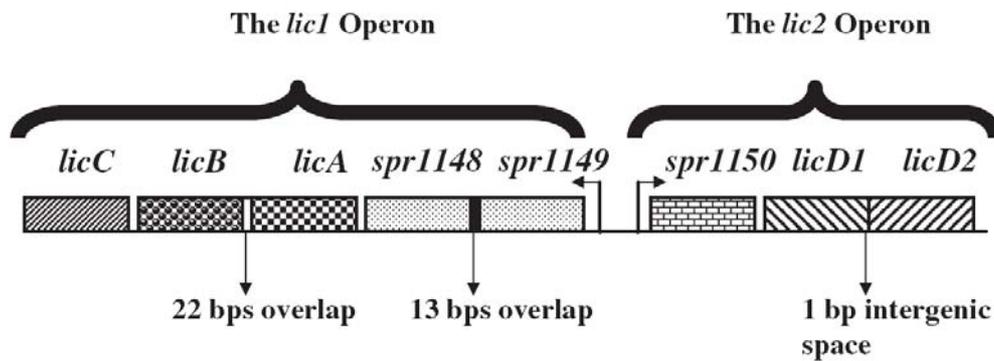


Figure 23. Représentation schématique du locus *lic* de *S. pneumoniae* R6. D'après Kharat et Tomasz, 2006.

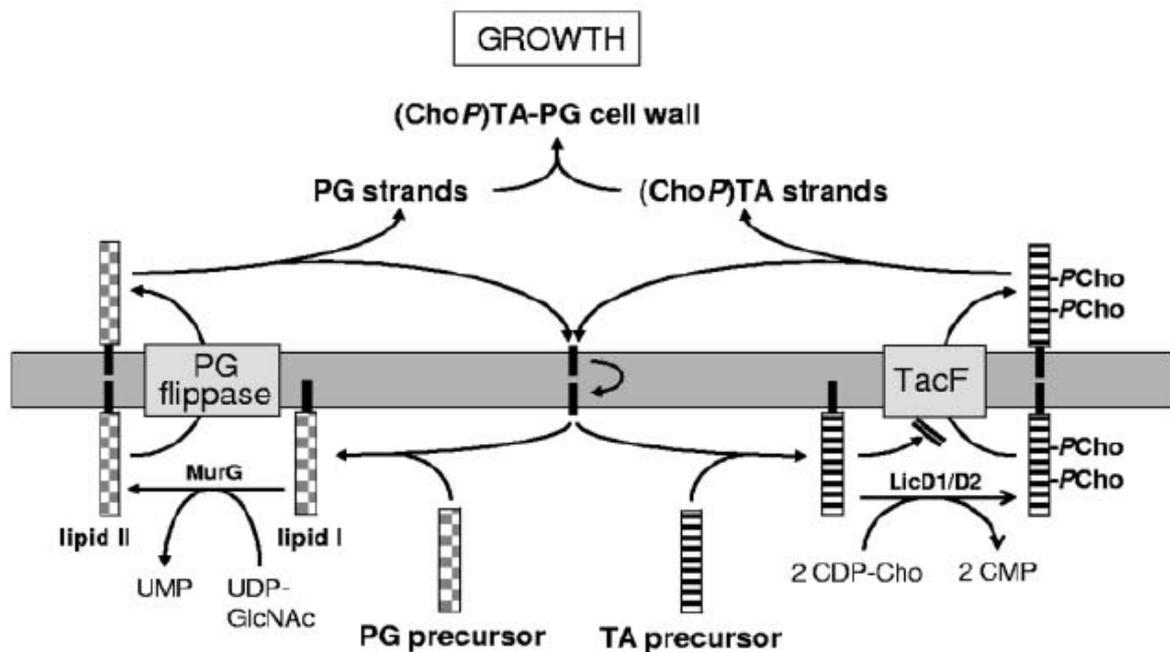


Figure 24. Modèle d'assemblage et d'export des acides teichoïques et du peptidoglycane de *S. pneumoniae* R6. D'après Damjanovic *et al.*, 2007.

transporteur spécifique de choline, et LicC une CTP-phosphocholine cytidyltransférase. L'inactivation de ces 3 gènes n'est pas tolérée dans la souche R6, sauf dans un mutant R6Cho⁻ indépendant à la choline (Kharat et Tomasz, 2006). Les gènes *spr1148* et *spr1149* coderaient respectivement pour une activité CDP-ribitol pyrophosphorylase et un transporteur de sucre (Zhang *et al.*, 1999). L'attachement des résidus phosphocholine sur les précurseurs des TA et LTA semble assuré par des protéines codées par les gènes *licD1* et *licD2* (Kharat et Tomasz, 2006). Très récemment, une étude a démontré une nouvelle fonction pour le gène *spr1150*, codant pour une protéine de type flippase, qui assure l'export des précurseurs des TA et LTA liés au lipide porteur. Ainsi, le gène *spr1150* a été renommé *tacF*, pour teichoic acid flippase (Damjanovic *et al.*, 2007). La mise en évidence de cette fonction apporte de nouvelles informations concernant le rôle de la choline dans la croissance. En effet, les auteurs soulignent que la protéine TacF semble reconnaître spécifiquement les précurseurs de TA et LTA décorés en choline, signifiant que l'absence de choline bloque leur export en surface (figure 24). Les précurseurs des TA et LTA liés au lipide porteur pourraient donc s'accumuler à l'intérieur de la cellule, et déstabiliser l'intégrité de la membrane. De plus, cette accumulation aurait tendance à mobiliser le pool de lipides porteurs intracellulaire qui ne seraient plus disponibles pour l'export du peptidoglycane, bloquant ainsi la croissance en absence de choline (figure 24).

Concernant la régulation du locus *lic*, peu d'informations sont disponibles à ce jour. Les premiers travaux à ce sujet ont démontré que la carence en choline provoquait une induction du gène *licD2* (Desai *et al.*, 2003). Par ailleurs, une étude très récente a montré la contribution du régulateur transcriptionnel CiaR, qui jouerait un rôle activateur pour l'opéron *lic1* lors de l'entrée en phase stationnaire (Halfmann *et al.*, 2007). Toutefois, la présence de deux séquences -10 devant *lic1* suggère une régulation plus complexe de cet opéron, ayant fait l'objet d'une partie de mon travail de thèse.

III.3 Les autres facteurs de pathogénicité de *S. pneumoniae*

Comme je l'ai déjà mentionné dans les parties précédentes, la dynamique de colonisation du pneumocoque et le processus d'infection font intervenir différents facteurs de virulence, assurant dans un premier temps l'adhésion (phase de colonisation), puis l'évasion du système immunitaire et l'invasion (phase d'infection). Au-delà du rôle fondamental du

polysaccharide capsulaire, plusieurs protéines de surface vont intervenir durant ces différentes étapes. Je détaillerai ici les principales protéines impliquées dans la virulence, et leur régulation si celle-ci est connue. Je tiens à noter qu'étant données les limitations des vaccins polysaccharidiques actuels (notamment en matière de couverture sérotypique), les différentes protéines dont je vais parler sont considérées comme des candidats pour de nouveaux vaccins. En effet, celles-ci sont potentiellement conservées pour l'ensemble des sérotypes.

III.3.1 Les enzymes lytiques

Les bactéries Gram+ possèdent une paroi composée de plusieurs couches de peptidoglycane. Cette structure n'étant pas figée mais en perpétuel remaniement, elle permet à la bactérie de s'adapter à son environnement. Cette restructuration permanente est sous la dépendance de différentes hydrolases de surfaces, capables de dégrader les liaisons covalentes de la paroi. Ces hydrolases sont retrouvées dans la majorité des bactéries, et jouent un rôle majeur dans la croissance, la division et la séparation des cellules filles (Lopez, 2006). Chez *S. pneumoniae*, cinq hydrolases de surface majeures ont été identifiées, à savoir LytA, LytB, LytC, Pce et Hyal. Les quatre premières ont en commun l'absolue nécessité de lier la choline présente dans les TA et LTA pour être fonctionnelles, et appartiennent donc à la famille des choline binding proteins.

✓ LytA : l'autolysine majeure de *S. pneumoniae*

LytA, l'autolysine majeure du pneumocoque, est une enzyme de type N-acetylmuramoyl-l-alanine amidase (Holtje et Tomasz, 1976), clivant les ponts peptidiques du peptidoglycane. Il s'agit de la première enzyme de nature autolytique caractérisée chez les bactéries (Garcia *et al.*, 1986). Une des caractéristiques principales du pneumocoque est la lyse en présence des sels biliaires, comme le désoxycholate de sodium. Cette lyse est en réalité directement dépendante de l'activité de LytA, dont les sels biliaires sont des inducteurs (Mosser et Tomasz, 1970). Bien que l'implication de cette protéine dans la virulence fasse l'objet d'une certaine controverse, plusieurs études lui attribuent des rôles directs et indirects. LytA jouerait par exemple un rôle direct dans la virulence en assurant la libération d'un

certaines nombres de composés de paroi, provoquant une forte réaction inflammatoire dans des modèles murins (Tuomanen *et al.*, 1985a; Tuomanen *et al.*, 1985b).

Par ailleurs, LytA jouerait un rôle indirect en assurant la lyse cellulaire, libérant différents facteurs de virulence comme la Pneumolysine (voir ci-après), qui n'est pas naturellement exportée par le pneumocoque (Mitchell *et al.*, 1997).

✓ LytB : responsable de la séparation des cellules

LytB est une muréine hydrolase (glucosaminidase), enzyme capable de cliver les liaisons entre les résidus N-acétyl glucosamine et N-acétyl muramique du peptidoglycane de *S. pneumoniae*. Les premiers travaux réalisés sur cette protéine ont montré qu'un mutant du gène *lytB* présente un phénotype fortement chaîné, ce qui suggère qu'elle est directement impliquée dans la séparation des cellules filles (Garcia *et al.*, 1999). Des travaux complémentaires ont confirmé cette hypothèse, démontrant que LytB est la principale enzyme impliquée dans le processus de séparation des cellules, vis-à-vis de *lytA* dont le mutant ne provoque qu'un chaînage très partiel (Sanchez-Puelles *et al.*, 1986).

Ce rôle de LytB est d'autant plus renforcé que cette enzyme s'accumule spécifiquement au niveau des pôles de la cellule, via un mécanisme de reconnaissance qui n'est pas totalement élucidé (De Las Rivas *et al.*, 2002). Ainsi, on attribue un rôle indirect à LytB dans la virulence, puisque la séparation des cellules a tendance à augmenter leur dispersion, ce qui est favorable au processus d'infection (Lopez, 2006).

✓ LytC : autolysine et lysozyme

LytC constitue la première enzyme de type lysozyme identifiée chez le pneumocoque. De la même manière que LytB, il s'agit d'une glucosaminidase capable de cliver les chaînes du peptidoglycane. Il est intéressant de noter que cette enzyme fonctionne en tant qu'autolysine lorsque les cultures sont incubées à 30°C (Garcia *et al.*, 1999). Ainsi, le rôle potentiel attribué à LytC serait de contribuer au mécanisme de compétence naturelle en favorisant le relargage d'ADN (induit lui-même par le mécanisme de compétence) (Steinmoen *et al.*, 2002).

En effet, la compétence naturelle de *S. pneumoniae* a généralement lieu dans les biofilms se formant dans la cavité orale et le nasopharynx, où la température est relativement proche de 30°C (Lee *et al.*, 2001).

✓ Pce : régulateur de la décoration en choline des TA et LTA

Pce est une acide teichoïque phosphorylcholine estérase, capable de cliver les résidus phosphocholine des TA et LTA de *S. pneumoniae* (Vollmer et Tomasz, 2001). Des expériences *in vitro*, réalisées avec cette enzyme purifiée, ont montré qu'elle était capable de cliver environ 20 % des résidus phosphocholine présents dans les TA et LTA. A priori, cette enzyme devient fonctionnelle à partir du moment où elle est sécrétée à travers la membrane (De Las Rivas *et al.*, 2001). Bien qu'aucune fonction précise ne lui ait encore été assignée, il est suggéré que cette enzyme joue un rôle dans la régulation de la disponibilité en choline pour les choline binding protein, et par conséquent leur fonction. De plus, le fait que cette enzyme soit capable de dégrader des résidus phosphocholine non liés à des sucres, suggère la possibilité qu'elle puisse dégrader certains composés présents dans l'hôte (De Las Rivas *et al.*, 2001), comme je l'ai déjà décrit dans le paragraphe III.2.2.

✓ Hyal : rôle direct dans l'invasion

Il ne s'agit pas, contrairement aux protéines précédentes, d'une choline binding protein puisque celle-ci est liée au peptidoglycane de façon covalente, bien qu'une certaine fraction semble libérée par le pneumocoque. Cette protéine a la capacité de dégrader des composés majeurs (sucres complexes) présents dans la matrice extracellulaire des tissus, comme les acides hyaluroniques ou les chondroïtines (Jedrzejewski, 2000; Jedrzejewski *et al.*, 2002). Ainsi, cette enzyme est directement impliquée dans les mécanismes d'invasion de l'hôte, bien que les mécanismes par lesquels la progression au sein des tissus s'effectue soient encore mal compris (Zwijnenburg *et al.*, 2001). Une hypothèse intéressante à souligner est qu'au-delà de la faculté d'invasion, les produits de dégradation de Hyal pourraient eux-mêmes constituer une source d'énergie potentiellement métabolisable par le pneumocoque (Jedrzejewski, 2007).

III.3.2 Les protéines impliquées dans l'adhésion

✓ PsaA, NanA et NanB : protéines essentielles pour la colonisation

Comme je l'ai déjà décrit dans le paragraphe II.2, ces protéines sont essentielles à la colonisation des voies aériennes supérieures par le pneumocoque. Notons que PsaA est directement ancrée à la membrane plasmique via un motif de nature lipidique, NanA étant liée au peptidoglycane de façon covalente via un motif LPXTG. Ce motif est une séquence d'acides aminés très conservée (X = n'importe quel acide aminé), permettant la liaison covalente d'un nombre important de protéines de surface chez les bactéries Gram+ à faible contenu en G+C (Lalioui *et al.*, 2005). Une caractéristique notable de *S. pneumoniae* est l'existence de deux types de neuraminidase distinctes NanA et NanB. Le fait que ces enzymes possèdent des pH optimums différents pour leur activité (5 pour NanA et 7 pour NanB) suggère une faculté d'adaptation supplémentaire pour le pneumocoque, dont les différentes niches possèdent des paramètres physico-chimiques différents (Berry *et al.*, 1996).

✓ CbpA : l'adhésine majeure du pneumocoque (aussi appelée PspC)

CbpA (choline binding protein A) a été identifiée comme la principale adhésine de *S. pneumoniae*, et fait partie des protéines prédominantes du pool protéique de la cellule (Rosenow *et al.*, 1997). Sa fonction d'adhésion a été mise en évidence à différents niveaux, à savoir les épithéliums du nasopharynx et des poumons (Cundell et Tuomanen, 1994; Rosenow *et al.*, 1997), ainsi que l'endothélium microvasculaire du cerveau (Ring *et al.*, 1998). Contrairement aux différentes protéines que je viens de décrire, CbpA ne joue pas simplement un rôle dans la colonisation des différentes niches. Comme déjà abordé dans le paragraphe II.2, plusieurs évidences montrent que CbpA joue, au delà de sa fonction d'adhésion, un rôle essentiel dans le mécanisme d'invasion des cellules hôtes, grâce à un certain nombre d'interactions. Concernant sa régulation, il a été récemment montré que le système à deux composantes TCS06 contrôle positivement la transcription de *cbpA* (Standish *et al.*, 2005).

✓ BgaA : beta-galactosidase de surface

La fonction de BgaA n'a pas encore été réellement définie à ce jour, bien qu'on sache qu'elle n'est pas impliquée dans le métabolisme du lactose. Il a toutefois été suggéré que cette enzyme de surface est impliquée dans la dégradation des polysaccharides de surface des cellules des épithéliums, soit un rôle indirect dans l'adhésion et l'interaction avec l'hôte (Zahner et Hakenbeck, 2000). Son exposition en surface est assurée par un ancrage covalent à la paroi, par l'intermédiaire d'un motif LPXTG, tout comme NanA. Il a été récemment démontré que le gène *bgaA* est régulé négativement par CcpA en présence de glucose (Kaufman et Yother, 2007). La phase de colonisation se produisant au niveau du nasopharynx, site classiquement dépourvu en glucose, on voit ici un moyen pour la bactérie de réguler un facteur de virulence spécifique à une niche écologique, en fonction de la disponibilité nutritionnelle environnante.

✓ La sortase SrtA : assure la fixation covalente de NanA et BgaA à la paroi

Nous avons vu jusqu'ici que la majorité des protéines de surface du pneumocoque sont liées à la choline, NanA et BgaA étant les seules présentant une fixation covalente à la paroi via un le motif LPXTG. Cette fixation covalente est assurée par une enzyme, la sortase SrtA présente chez *S. pneumoniae* et la plupart des bactéries Gram-positives (Lalioui *et al.*, 2005).

Il a été démontré que l'inactivation du gène *srtA* chez *S. pneumoniae* provoque d'une part un relargage des protéines NanA et BgaA dans le milieu, et d'autre part une chute de la capacité d'adhérence de 50 à 90 % ce qui souligne le rôle indirect de la sortase dans la virulence (Kharat et Tomasz, 2003)

✓ Autres protéines impliquées dans l'adhésion

Je mentionnerai deux protéines supplémentaires impliquées dans l'adhésion, à savoir PavA et PavB (pneumococcal adhesin et virulence protein), dont l'attachement au complexe paroi-membrane est encore inconnu. Ces deux protéines ont la propriété de se fixer aux fibronectines, glycoprotéines fortement représentées dans l'hôte au niveau des épithéliums et du liquide céphalo-rachidien, et jouerait un rôle important dans la virulence. (Bumbaca *et al.*, 2004; Holmes *et al.*, 2001).

III.3.3 Autres protéines d'intérêt

✓ PspA : protection contre le système immunitaire

PspA (pneumococcal surface protein A) est une choline binding protein, dont le rôle principal est d'éviter à la bactérie d'être reconnue (opsonisée) par le système du complément (cascade biochimique participant à la réponse immunitaire), et donc d'être phagocytée par les macrophages (Tu *et al.*, 1999). De plus, PspA présente une affinité pour les lactoferrines, glycoprotéines ayant la capacité de fixer le fer présent dans les muqueuses (au niveau extracellulaire) comme le nasopharynx. Le fer étant un élément essentiel pour la croissance bactérienne, l'interaction de PspA avec les lactoferrines permet d'augmenter la disponibilité en fer ce qui favorise la colonisation du pneumocoque (Hammerschmidt *et al.*, 1999). De la même manière que CbpA, le système à deux composantes TCS06 contrôle la transcription de *pspA*, mais de façon négative (Standish *et al.*, 2007).

✓ Pneumolysine

La Pneumolysine constitue l'un des éléments clé de la virulence du pneumocoque, et est potentiellement présente chez l'ensemble des sérotypes (Kalin *et al.*, 1987). Cette protéine est souvent décrite pour sa capacité à former des pores, et son inhibition par la présence de cholestérol (Andrew *et al.*, 1997). A quantité élevée, la Pneumolysine possède une forte activité lytique pour toutes les cellules possédant du cholestérol dans leur membrane, suggérant que le cholestérol est un récepteur pour cette protéine (Boulnois *et al.*, 1991). Ces concentrations élevées, probablement présentes aux stades tardifs de l'infection, favorisent la dissémination au sein des tissus en provoquant leur dégradation (Gilbert *et al.*, 1999). Des concentrations moindres en Pneumolysine, généralement observées dans des stades plus précoces de l'infection, peuvent provoquer des phénomènes d'apoptose chez les cellules hôtes (Braun *et al.*, 2002), ou encore l'activation du système du complément (Mitchell *et al.*, 1991).

Je noterai que la lyse des cellules est un pré requis essentiel à la libération de la Pneumolysine, celle-ci ne possédant pas d'adressage particulier pour un mécanisme de sécrétion (Hirst *et al.*, 2004).

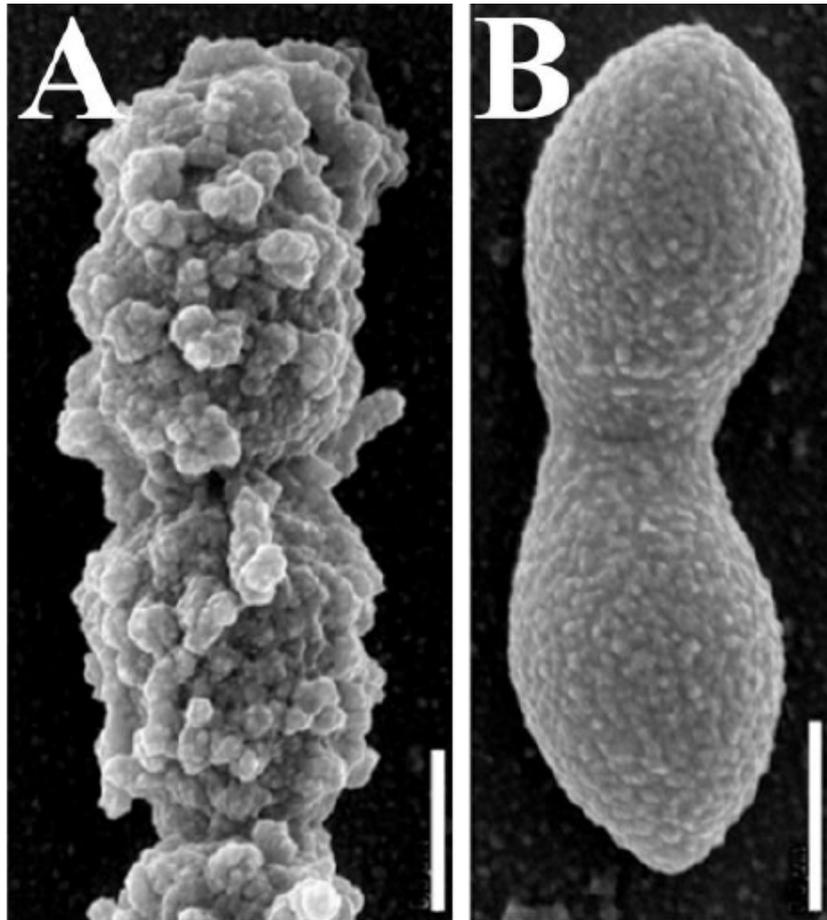


Figure 25. Vue au microscope électronique des variants opaques (A) et transparents (B) de *S. pneumoniae*. D'après Hammerschmidt *et al.*, 2005. Barre = 0,5 μm .

IV. Le mécanisme de variation de phase

Comme abordé précédemment, *S. pneumoniae* peut se présenter sous différents aspects morphologiques, directement associés à la mise en place de facteurs de virulence. Ainsi, il est possible de distinguer deux phénotypes principaux, à savoir le phénotype transparent (T) faiblement capsulé et le phénotype opaque (O) fortement capsulé (figure 25). Un troisième phénotype dit intermédiaire (I) a lui aussi été décrit bien que moins détaillé, qui comme son nom l'indique est un « compromis morphologique » des deux précédents (Serrano *et al.*, 2006). La capacité du pneumocoque à exister sous ces différentes formes a été nommée variation de phase, par homologie avec des phénomènes similaires déjà décrits pour d'autres pathogènes comme *H. influenzae* (Serrano *et al.*, 2006; Weiser *et al.*, 1998) ou *N. meningitidis* (Stern et Meyer, 1987). Ce mécanisme semble commun à l'ensemble des souches de pneumocoques, bien qu'il soit plus facile de le mettre en évidence chez certains sérotypes. Si on s'intéresse plus précisément aux différents facteurs de virulence, les principales variations morphologiques observées entre phénotype transparent et opaque sont les suivantes :

- ✓ le phénotype opaque possède entre 1.2 et 5.6 fois plus de polysaccharide capsulaire que le phénotype transparent.
- ✓ le phénotype transparent possède entre 2.1 et 3.8 fois plus de TA et LTA (Kim *et al.*, 1999).
- ✓ le phénotype transparent possède des quantités accrues en protéines de surface comme CbpA et LytA (Weiser *et al.*, 1994).

Ces différences morphologiques ont été directement associées avec la capacité de virulence de *S. pneumoniae*. En effet, les phénotypes opaques présentent en général une virulence accrue dans des modèles murins, et une diminution de sensibilité à l'opsonophagocytose. Les phénotypes transparents possèdent pour leur part une meilleure capacité de colonisation sur des modèles murins, une adhésion accrue sur les pneumocytes, ou encore une meilleure prédisposition à la transcytose (Kim *et al.*, 1999; Weiser *et al.*, 1994).

Ainsi, le phénotype transparent est classiquement associé au nasopharynx, siège de la colonisation, par opposition au phénotype opaque qu'on retrouve dans la phase d'infection au niveau des tissus et du sang. Il est intéressant de noter que l'invasion des tissus de la muqueuse nasale par le phénotype opaque de *S. pneumoniae* pourrait constituer une stratégie de portage à long terme, permettant aux bactéries de revenir en surface sous forme transparente afin de maintenir la population (Briles *et al.*, 2005). L'existence de ces différents phénotypes souligne encore une fois l'aisance avec laquelle le pneumocoque est capable de s'adapter à des environnements très différents.

Concernant la manière avec laquelle la bactérie régule la variation de phase, le sujet fait l'objet d'une recherche intensive mais à ce jour, aucun mécanisme n'a réellement été mis en évidence. Toute la difficulté d'élucidation réside dans le caractère multifactoriel de ces transitions, le mécanisme ne pouvant pas se résumer à une seule observation. En effet, plusieurs travaux ont tendance à attribuer la réversibilité vers un phénotype non capsulé uniquement par des phénomènes d'insertions génétiques au niveau des locus clés, comme le locus capsulaire (Waite *et al.*, 2001). Même s'il peut s'agir d'un des facteurs importants, il est relativement aisé d'obtenir des souches non capsulées *in-vitro* au bout de X générations, en les plaçant dans des conditions où elles perdent l'intérêt d'une production capsulaire.

J'aurai l'occasion de discuter plus particulièrement de ce point dans la conclusion de mon travail, en revenant notamment sur les conditions que peut rencontrer le pneumocoque *in vivo*.

V. Conclusion

L'une des avancées majeures ces quinze dernières années concernant l'étude des bactéries pathogènes est sans aucun doute l'avènement du séquençage des génomes, et le développement exponentiel des techniques génomiques. En effet, ces différents outils ont permis ou devraient permettre de caractériser de façon plus précise les principaux facteurs impliqués dans la pathogénicité, et par conséquent d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouveaux candidats pour des vaccins.

Dans le cas du pneumocoque, la diversité sérotypique ainsi que la plasticité du génome ne facilite pas cette démarche de compréhension et de caractérisation. Il est en effet très probable que le génome d'une souche individuelle présente des caractéristiques qui lui sont propres, et directement en lien avec sa capacité de virulence (Barocchi *et al.*, 2007). De plus, le niveau de régulation d'un génome n'est pas la condition unique à la mise en place de la virulence, qui peut directement dépendre de l'environnement dans lequel un isolat a été prélevé.

Il est donc nécessaire d'une part d'obtenir de plus amples informations sur le génome des souches de pneumocoque (4 génomes sont déjà entièrement séquencés, et 9 sont en cours de séquençage), et d'autre de part renforcer les connaissances sur la physiologie de cette bactérie qui est encore mal connue.

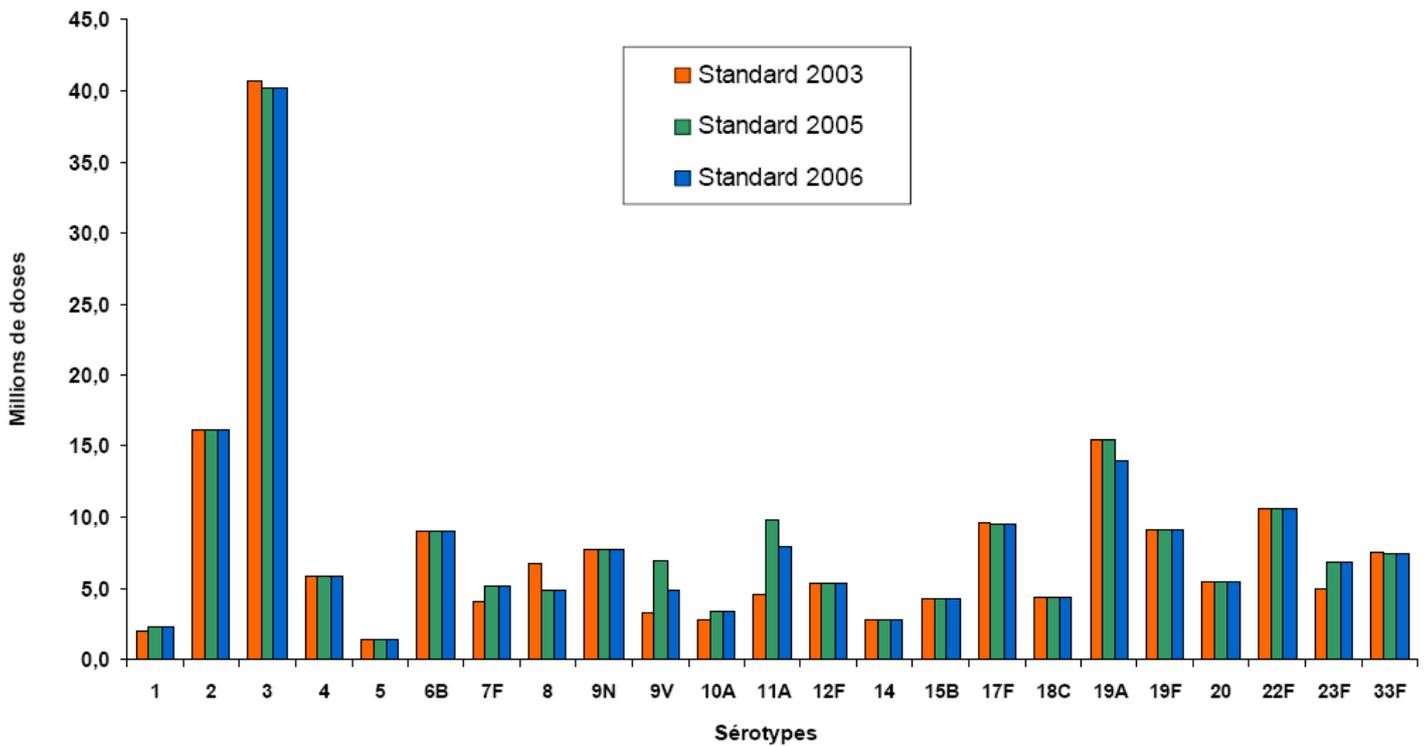


Figure 26. Diagramme des standards de production entre 2003 et 2006 pour les différents sérotypes composant le Pneumo 23. Données Sanofi-Pasteur.

VI. Problématique du sujet et objectifs de mon travail de thèse

VI.1 Problématique

Le point de départ de ce travail de thèse est un besoin de la part de l'industriel d'améliorer les connaissances concernant la production du polysaccharide capsulaire par le pneumocoque, dans le cadre de la production du vaccin Pneumo 23. En effet, la production réalisée avec les 23 sérotypes présente une forte disparité, tant au niveau de la productivité que de la qualité du produit. Au-delà, une meilleure compréhension pourrait permettre de cibler des paramètres critiques en vue d'une amélioration de la productivité de ce procédé.

Concernant l'aspect productivité, la figure 26 montre le spectre de productivité (en million de doses) entre 2003 et 2006 pour l'ensemble des sérotypes composant le vaccin. On peut voir aisément sur ce graphique que certains sérotypes comme le sérotype 1 ou le sérotype 5 produisent extrêmement peu de polysaccharide capsulaire vis-à-vis des autres. Par opposition, le sérotype 3 a une productivité extrêmement élevée, probablement en accord avec son mécanisme de synthèse capsulaire atypique déjà décrit dans le paragraphe III.1.2.

Concernant la qualité du produit, la libération d'un lot de production pour commercialisation impose un nombre important de spécifications, et notamment la taille du polysaccharide capsulaire. Celle-ci est déterminée par chromatographie basse pression, via le calcul d'un coefficient de partition KD, dont la valeur est inversement proportionnelle à la taille du polysaccharide capsulaire (cf. Matériels et méthodes, paragraphe III.5.2). Pour chacun des sérotypes, une spécification de taille a été établie et communiquée aux autorités de santé. Depuis quelques années, un certain nombre de sérotypes présentent des non conformités en terme de taille et donc de qualité, nécessitant d'écarter plusieurs lots de production.

Au-delà du coût extrêmement élevé que peuvent engendrer des pertes, le fait que le vaccin Pneumo 23 soit une combinaison de différents sérotypes oblige l'entreprise à disposer de réserves en polysaccharide purifié, et ce pour chacune des valences. En effet, dans le cas

d'un épuisement d'une seule valence, la production du vaccin lui-même peut être totalement compromise.

VI.2 Objectifs et plan de mon travail de thèse

D'après la problématique que je viens d'énoncer, il apparaît fondamental pour l'entreprise de mieux maîtriser le procédé de production du Pneumo 23, et c'est dans ce cadre que s'est inscrit mon travail de thèse. L'objectif initial n'était pas pour autant une nécessité de faire évoluer le procédé, mais de mieux comprendre comment s'effectue la production capsulaire du pneumocoque dans ces conditions industrielles. Je montrerai par la suite que cette démarche de compréhension a cependant permis des améliorations notables.

VI.2.1 Aspect fondamental : compréhension du déterminisme de synthèse capsulaire de *S. pneumoniae*

La résolution d'une problématique de production ne peut se limiter à des modifications ponctuelles au niveau du procédé. Il est en effet indispensable de commencer par comprendre les mécanismes par lesquels le produit d'intérêt est synthétisé par le microorganisme.

Dans le cas d'un facteur de virulence, cette compréhension est d'autant plus délicate, car il est généralement difficile de reproduire des conditions *in vivo*. Comme j'ai pu l'aborder dans les parties précédentes, les mécanismes assurant et régulant la synthèse capsulaire du pneumocoque, et plus généralement la physiologie de ce microorganisme sont encore mal compris.

Le premier objectif a donc été de caractériser à différents niveaux d'analyse le comportement du pneumocoque dans le contexte de culture industrielle de Sanofi-Pasteur. Pour ce faire, je disposais du riche réservoir de sérotypes de l'entreprise, sérotypes qui comme présentés en figure 26 diffèrent dans leur capacité à produire leur capsule. L'idée a donc été de choisir un sérotype de référence sans « problèmes » particuliers de production, et un sérotype avec un profil de productivité atypique. La référence que j'ai choisie est le sérotype 4 qui présente, au-delà d'un profil standard en production, l'avantage qu'une souche du même type capsulaire a déjà été entièrement séquencée (TIGR 4). Pour le sérotype « à problèmes »,

le choix s'est porté sur le sérotype 5 qui présente la plus faible productivité pour l'ensemble des sérotypes utilisés chez Sanofi-Pasteur.

La stratégie adoptée consiste à utiliser une démarche expérimentale déjà en place au sein de mon laboratoire pour d'autres bactéries lactiques. Cette démarche commence par l'évaluation à différents niveaux du comportement des souches choisies, la première étape étant le niveau macrocinétique dans l'environnement contrôlé du fermenteur. Par la suite, ce travail consiste à analyser le comportement moléculaire, à la fois au niveau du métabolisme central et au niveau génétique.

VI.2.2 Aspect industriel : amélioration des potentialités de production au niveau fermentaire pour le procédé Pneumo 23

Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la synthèse du polysaccharide capsulaire du pneumocoque m'a permis d'identifier des cibles potentielles d'amélioration du procédé. Dans ce cadre, j'ai engagé dans un premier temps une série d'essais à l'échelle pilote, permettant de visualiser le comportement d'un nombre étendu de sérotypes dans des conditions standards. Par la suite, j'ai apporté plusieurs modifications au niveau des paramètres nutritionnels ayant entraîné des améliorations significatives sur les deux problématiques de taille et de productivité. Enfin, j'ai eu la chance de conduire des essais à l'échelle industrielle, ce qui a permis de démontrer que les modifications étaient directement applicables à la production du vaccin.

Chapitre II : Matériel et Méthodes

Table 9. Souches utilisées au cours de ce travail.

Souches	Caractéristiques	Référence
<i>S. pneumoniae</i> type 4	Isolat clinique capsulé	Staten Serum Institute <u>n°34348</u>
<i>S. pneumoniae</i> type 5	Isolat clinique capsulé	Collection Pr Austrian Philadelphie USA <u>n°Pn5M</u>
<i>S. pneumoniae</i> type 8	Isolat clinique capsulé	Staten Serum Institute <u>n°195a</u>
<i>S. pneumoniae</i> type 20	Isolat clinique capsulé	Laboratoire d'analyses médicales Lyon <u>n°IM1817</u>
<i>S. pneumoniae</i> type 33F	Isolat clinique capsulé	Staten Serum Institute <u>n°3077/37</u>
<i>S. pneumoniae</i> R6	Dérivé type 2 non capsulé	LMGM Toulouse (Martin <i>et al.</i> , 1985)

I. Souches

Plusieurs souches de pneumocoques ont été utilisées pour la réalisation de ce travail. La souche pathogène de référence choisie est un isolat clinique de sérotype 4 de *Streptococcus pneumoniae*, fourni par Sanofi-Pasteur. J'ai choisi cette souche en tant que référence pour différentes raisons :

- ✓ un isolat du même sérotype a déjà été entièrement séquencée en 2001, sous le nom TIGR4, et constitue la souche pathogène de référence dans la plupart des publications (Tettelin *et al.*, 2001) (numéro d'accèsion Genbank AE005672)
- ✓ cette souche, utilisée en production vaccinale chez Sanofi-Pasteur, ne présente pas de problème particulier dans le procédé industriel
- ✓ des puces à ADN commerciales de *S. pneumoniae* sont disponibles pour la souche séquencée TIGR4

D'autres sérotypes pathogènes ont été utilisés au cours de l'étude, à savoir les sérotypes 5, 8, 20 et 33F, s'agissant toujours d'isolats cliniques fournis par Sanofi-Pasteur. Enfin, une souche modèle nommée R6 a été utilisée pour la réalisation des travaux de génie génétique. Il s'agit d'une souche non capsulée (non pathogène) dérivée du sérotype 2, présentant une délétion de 7.5 kb au niveau de l'opéron capsulaire. Elle présente le double avantage d'être facilement transformable (donc un outil de choix pour des travaux de génie génétique), et d'avoir un isolat dont le génome a été lui aussi entièrement séquencé (Hoskins *et al.*, 2001) (numéro d'accèsion Genbank AE007317). Les références des différentes souches utilisées sont précisées dans la table 9.

Table 10. Composition des milieux de culture utilisés en g.l⁻¹.

	MSP*	M17		MSP*	M17
Glucose	12	12	Calcium pantothénate	$5,6 \cdot 10^{-3}$	
Tryptone de caséine	33,5	5	Thiamine chlorhydrate	$1,1 \cdot 10^{-3}$	0,020
Peptone de soja		5	Riboflavine	$1,1 \cdot 10^{-3}$	0,047
Extrait de bœuf		5	Adénine sulfate	0,01	
Extrait de levure		2.5	Uracile	0,01	
Asparagine	0,11		Acide Nicotinique	$1,1 \cdot 10^{-3}$	
Glutamine	0,7		Choline chlorure	0,01	
Tryptophane	0,022		Glycérophosphate sodique		19
Tyrosine	0,22		KH ₂ PO ₄	5,55	
Cystéine	0,17		MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,56	
Alanine	0,24		FeSO ₄ , 4 H ₂ O	$5,6 \cdot 10^{-3}$	
Arginine	0,12		ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	$8,9 \cdot 10^{-4}$	
Asparagine	0,34		MnSO ₄ , 1 H ₂ O	$4 \cdot 10^{-4}$	
Acide ascorbique		0,5	NaHCO ₃	1,12	
Biotine	$1,7 \cdot 10^{-6}$		Acide thioglycolique	0,15	
Pyridoxal hydrochloride	$1,1 \cdot 10^{-3}$		Catalase	$4 \cdot 10^{-3}$	

* milieu Sanofi-Pasteur.

II. Cultures

II.1 Milieux de culture

II.1.1 Composition

Deux milieux de culture complexes ont été utilisés au cours de cette étude. La culture des sérotypes pathogènes a été réalisée avec le *milieu pneumo* de Sanofi-Pasteur (MSP) utilisé pour la production industrielle de polysaccharide capsulaire. Ce milieu complexe a une composition très proche du milieu Hoeprich (Hoeprich, 1955), à l'exception du type de tryptone utilisé et de la quantité de glucose ajouté. La culture du sérotype non pathogène R6 a été réalisée en utilisant le milieu commercial M17 (Becton Dickinson) supplémenté à 12 g.l⁻¹ en glucose (comme le MSP), utilisé classiquement pour la culture des Streptocoques lactiques. La composition de ces différents milieux est présentée dans la table 10.

II.1.2 Préparation des milieux

II.1.2.1 Milieu pneumo Sanofi-Pasteur

Afin de reproduire au mieux les conditions de cultures utilisées en production, la préparation du milieu pneumo a été réalisée selon les préconisations données par Sanofi-Pasteur à savoir :

- ✓ Milieu de base pneumo : contenant la tryptone, la tyrosine, le tryptophane et la cystéine
- ✓ Solution vitamines sels facteurs de croissance
- ✓ Solution Bicarbonate et acide thioglycolique
- ✓ Solution de glucose 50 %

✓ Solution de catalase

Chacune de ces solutions est préparée indépendamment, le milieu de base étant directement ajouté par filtration 0,22 μm (Millipack 100 de Millipore) dans les flacons de préculture (stockés à 36°C) et dans les fermenteurs (régulés à 15°C) la veille de la culture. Les quatre autres solutions servent à la préparation d'une solution d'enrichissement qui sera rajoutée avant ensemencement à raison de 112 ml par litre de milieu de base (par filtration 0,22 μm). 1 l de solution d'enrichissement comprend 500 ml de solution vitamines-sels-facteurs de croissance, 250 ml de solution de bicarbonate-acide thioglycolique, 250 ml de solution de glucose 50 % et 1 ml de solution de solution de catalase. Cette solution d'enrichissement est préparée la veille de la culture, et répartie stérilement par filtration 0,22 μm (Millipack 100 de Millipore). Elle est stockée overnight à 4°C, à l'abri de la lumière en attente du démarrage de la culture. Les différentes solutions sont préparées dans une zone dédiée à la préparation des milieux, puis transférées en zone bactériologie.

II.1.2.2 Milieu M17

Le milieu M17 est préparé selon les recommandations du fournisseur (Becton Dickinson), supplémenté en glucose (12 g/l final) puis filtré avec un filtre Sartorius 0,22 μm .

II.2 Techniques de culture

II.2.1 Conservation des souches

Les souches pathogènes de *S. pneumoniae* sont conservées sous formes lyophilisées chez Sanofi-Pasteur dans un environnement P3 à 4°C. Pour la souche non pathogène R6, des cellules récoltées en phase exponentielle de croissance sur milieu M17 glucose sont conservées dans des cryotubes avec 20 % (V/V) de glycérol, et stockées à -80 °C.

II.2.2 Culture des souches pathogènes

II.2.2.1 Environnement de travail

L'ensemble des cultures de souches pathogènes de *S. pneumoniae* a été effectué au sein d'une des zones bactériologiques confinées de Sanofi-Pasteur. Il s'agit d'un environnement P3 dans lequel l'absence de phases ouvertes (contact avec l'atmosphère) doit être maintenue, à l'exception du traitement des échantillons sous un poste de sécurité microbiologique (PSM).

II.2.2.2 Précultures

Le schéma de préculture a été mis en place en se basant sur le procédé industriel de production de polysaccharide capsulaire de Sanofi-Pasteur. Toutefois, une stratégie de congélation a été mise en place au cours de mon étude, afin de mieux maîtriser la qualité de l'inoculum et les étapes de préculture. Ceci a notamment permis de limiter la variabilité entre les différents essais, le caractère reproductible étant le pré requis nécessaire à des analyses moléculaires de qualité.

✓ Premier stade de préculture sur boîte de Petri

La première étape de préculture est effectuée sur boîtes de Petri (diamètre 90 mm), contenant une gélose trypticase soja additionnée de 5 % de sang de cheval (*Biomérieux*). 1 ml de bouillon trypticase soja (*Biomérieux*) sert à reprendre le lyophilisat, 200 µl étant déposés sur chaque boîte (4 boîtes serontensemencées) puis étalés à l'aide d'un râteau en plastique stérile. Les boîtes sont alors incubées dans une étuve à 36°C pendant 24 h. Notons que la présence de sang dans les géloses permet d'une part de fixer l'oxygène (par l'hémoglobine) et donc de limiter son impact négatif sur la croissance, et d'autre part de mieux visualiser les colonies.

✓ Deuxième stade de préculture : 100 ml de milieu

Après contrôle macroscopique (présence d'une nappe homogène), la reprise de chaque boîte est effectuée avec 2 ml de bouillon trypcase soja à l'aide d'un râteau en plastique stérile. La reprise de 4 boîtes (soit 8 ml) permet l'ensemencement sous hotte PSM d'un flacon Schott de 250 ml stérile (121°C, 30 min) contenant 100 ml de milieu de base pneumo et 11,2 ml de solution d'enrichissement. La culture est réalisée à 36°C sous agitation (50 rpm), jusqu'à atteinte de la phase exponentielle de croissance ($DO_{694\text{ nm}} = 0,3$ à $0,4$).

✓ Troisième stade de préculture : 1 l de milieu

La deuxième préculture permet l'ensemencement d'un flacon Schott de 2 l stérile (121°C, 30min) contenant 1 l de milieu de base pneumo et 112 ml de solution d'enrichissement. La culture est réalisée à 36°C sous agitation (50 rpm), jusqu'à atteinte de la phase exponentielle de croissance ($DO_{694\text{ nm}} = 0,3$ à $0,4$).

Remarque : les phases de préculture sont réalisées en atmosphère d'air. Toutefois, l'impact de l'oxygène reste minime étant donné la présence de thioglycolate dans le milieu de culture, qui est un réducteur puissant.

✓ Congélation d'inocula

Afin d'homogénéiser l'ensemble des essais, une stratégie de congélation a été mise en place après atteinte de la phase exponentielle de croissance lors du troisième stade de préculture. Des aliquots de 40 ml de culture sont conservés dans des tubes Falcons 50 ml avec 20 % (V/V) de glycérol puis stockés à -80 °C. Quatre tubes sont décongelés overnight à 4°C, centrifugés à 5400 rpm, puis lavés volume à volume avec du milieu de base. Un flacon Schott 2 l stérile (121°C, 30 min), contenant 1 l de milieu de base pneumo et 112 ml de solution d'enrichissement peut ainsi être inoculé. La préculture est alors menée de la même manière que le troisième stade.

II.2.2.3 Culture en fermenteur

Ces cultures sont réalisées dans des fermenteurs de 5 l (B-Braun), un module DCU permettant de réguler les différents paramètres de culture. Le fermenteur est stérilisé à vide par envoi de vapeur directement dans la cuve (121°C, 30min) la veille de la culture. Le milieu

de base est ensuite introduit stérilement dans le fermenteur par filtration à travers une cartouche 0,22 μm (Millipore), puis stocké overnight à 15°C (refroidissement par double enveloppe) en légère surpression avec une agitation de 30 rpm. Le jour de culture, le fermenteur est placé à une température de 36°C sous une agitation de 50 rpm, puis dégazé en CO_2 jusqu'à atteindre une valeur de PO_2 stable autour de 0 (contrôlée par sonde PO_2). Le pH est ensuite ajusté à 7,2 par ajout automatique de soude 20 %, puis la solution d'enrichissement est ajoutée stérilement (là encore, le risque d'amener de l'oxygène via les différents ajouts dans le fermenteur est limité, du fait de la présence de thioglycolate dans le fermenteur). Chaque fermenteur est inoculé avec 400 ml de cellules issues des précultures, puis régulé à un pH de 7,2, à une température de 36°C sous une agitation de 50 rpm. Le suivi de culture est effectué pendant 13 h, basé sur les conditions utilisées en production industrielle. Pour information, le suivi des cultures a pu être effectué au maximum pendant 8 h de culture et ce pour des raisons de sécurité propres à l'industriel. Cependant, une mise sous froid à 15°C programmée à 13 h permet d'avoir un point correspondant à la fin de culture.

II.2.3 Culture de la souche non pathogène R6

II.2.3.1 Précultures

Les précultures sont réalisées dans des flacons Schott 2 l dans lesquels le milieu de culture M17 est filtré stérilement avec un filtre Sartorius 0,22 μm . La stratégie d'inoculum utilisée est la même que celle décrite précédemment, à savoir l'utilisation de cellules en phase exponentielle de croissance dans les mêmes conditions de température et d'agitation.

II.2.3.2 Culture en fermenteur

Ces cultures sont réalisées dans un fermenteur de 2 l (Chemap) de l'INSA Toulouse, possédant un module de contrôle des différents paramètres de culture. Les paramètres de conduites utilisés sont exactement les mêmes que ceux décrits pour la culture des sérotypes pathogènes.

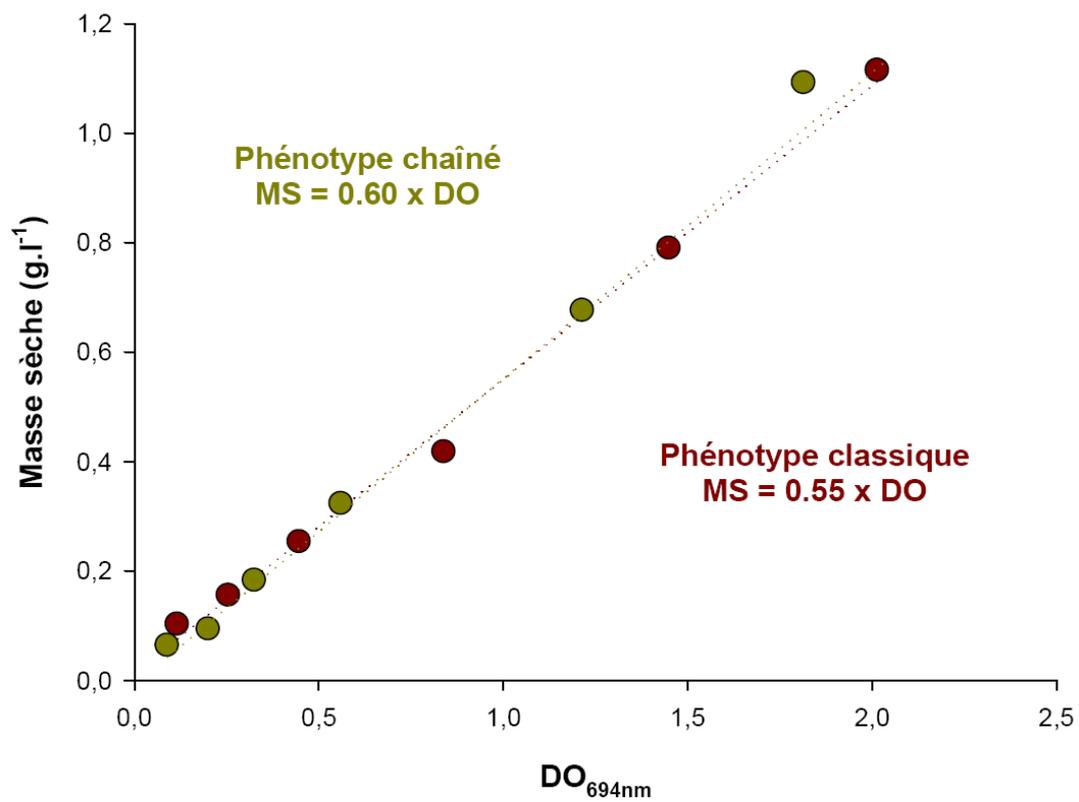


Figure 27. Corrélation DO / Masse sèche (MS) des souches capsulées, pour le phénotype classique (diplocoque) ou en chaînettes de *S. pneumoniae*.

III. Techniques analytiques exocellulaires

III.1 Mesure de la concentration en biomasse

III.1.1 Turbidimétrie

Pour l'évaluation instantanée de la croissance cellulaire, des mesures de densité optique (DO) ont été effectuées à 694 nm selon les préconisations de Sanofi-Pasteur, à l'aide d'un spectrophotomètre (Jasco V530 chez Sanofi-Pasteur, et Hitachi U1100 à l'INSA Toulouse). Si nécessaire, les échantillons sont dilués dans de l'eau physiologique pour rester dans la gamme de linéarité de l'appareil ($DO < 0,6$).

III.1.2 Gravimétrie

La biomasse contenue dans un échantillon de volume connu est déterminée par pesée après filtration sur une membrane de porosité 0,22 μm , lavage des filtres et séchage à l'étuve sous vide (200 mbar, 60°C) pendant 24 heures. Le poids sec est déterminé par différence entre les masses du filtre avant et après filtration. Comme présenté en figure 27, une corrélation entre la densité optique à 694 nm ($DO_{694\text{nm}}$) et la concentration en biomasse (X , en g.l^{-1}) a été établie, et ce pendant la phase exponentielle de croissance. Dans certaines conditions, la filamentation des souches (chaînettes) se traduit par une légère variation de la corrélation.

III.2 Dosage des substrats et produits de fermentation

Les surnageants des échantillons prélevés lors des cultures (filtrés 0,22 μm) sont analysés par chromatographie liquide à haute pression (HPLC). Le système d'HPLC (Hewlett Packard series 1050) est équipé d'un passeur automatique (Waters 717 Autosampler), d'une précolonne (Biorad Microguard) et d'une colonne de type H^+ (Biorad HPX87H) qui effectue

une séparation par échange d'ions et exclusion. L'analyse des échantillons est réalisée à 48 °C avec un débit d'éluant (H₂SO₄ 5 mM) de 0,5 ml.min⁻¹. La détection est assurée par un spectrophotomètre UV (Perkin Elmer LC90Bio) à 210 nm pour le lactate, l'acétate et le formiate, et un réfractomètre (Hewlett Packard series 1047A) pour le glucose et l'éthanol, tous 2 branchés en série. Les concentrations de ces composés dans les surnageants de culture sont déterminées grâce au dosage de solutions étalons. Il faut noter qu'un suivi en ligne du glucose et du lactate chez Sanofi-Pasteur a été effectué au moyen d'un analyseur YSI 2700.

III.3 Dosage du polysaccharide capsulaire

Le dosage du polysaccharide capsulaire fait référence à la technique développée par Philippe Talaga au sein du Département Recherche Biochimie de Sanofi-Pasteur (Talaga *et al.*, 2002). Le principe de cette technique est de doser par chromatographie d'échange anionique un sucre caractéristique de la capsule du sérotype analysé, connaissant au préalable le pourcentage de ce sucre dans le polysaccharide. Mon choix s'est porté sur cette technologie car il était nécessaire d'employer une technologie équivalente à celle utilisée en production. D'autre part, les techniques classiquement utilisées dans la plupart des publications scientifiques sont de type réfractométriques (Dosage de type « Quellung »), ou encore de type néphélométrie / Elisa, donnant une variabilité importante dans les résultats.

III.3.1 Prise d'échantillons en culture

Le polysaccharide capsulaire étant directement ancré à la paroi du pneumocoque, il est nécessaire d'effectuer une lyse des cellules lors de la prise d'échantillons en cours de culture. Classiquement, 10 ml de culture sont placés dans un tube Corning 15 ml directement supplémenté avec 50 µl de désoxycholate de sodium 20 % (sel biliaire inducteur de l'autolysine). Après homogénéisation (vortex pendant 10 sec), l'échantillon est laissé à température ambiante pour un temps de contact d'une heure, puis directement stocké à -80°C. Le jour du dosage, 1,5 ml d'échantillon décongelé overnight à 4°C est centrifugé 10 min à 13000 rpm, afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est récupéré pour la suite de la manipulation.

III.3.2 Dialyse des échantillons

Afin d'éliminer les molécules de petites tailles (sucres simples résiduels, acides aminés et protéines) pouvant perturber l'analyse, une dialyse des échantillons est réalisée au moyen de cassettes de dialyse 10 kD (Pierce, 10000 MWCO). 1 ml de surnageant est introduit (au moyen d'une seringue et d'une aiguille) à l'intérieur du système, les cassettes ayant été humidifiées à l'eau au préalable. Les cassettes ainsi chargées sont placées dans un bain d'eau milliQ à 4°C pendant 48 h.

L'eau doit être changée tous les 12 h. L'échantillon dialysé est récupéré au moyen d'une seringue puis son volume mesuré, afin de tenir compte du facteur de dilution consécutif à la dialyse. L'échantillon est ensuite stocké à -20°C en attente d'analyse.

III.3.3 Hydrolyse des échantillons et de la gamme étalon

III.3.3.1 Sérotypes 4, 8, 20 et 33F

Pour ces quatre sérotypes, le sucre spécifique à doser est le galactose (table 11). Une gamme étalon de galactose (Gal) est préparée à partir d'une solution de galactose à 1 mg / ml :

- ✓ Préparation d'une solution à **40 µg / ml** : dilution au 1/25 → 400 µl qsp 10 ml H₂O
- ✓ Préparation d'une solution à **10 µg / ml** : dilution au 1/100 → 100 µl qsp 10 ml H₂O

En parallèle, la préparation des échantillons à doser s'effectue en utilisant trois prises d'essais de 25 µl, 50 µl et 100µl qsp 400 µl H₂O milliQ. Ainsi, il est possible de couvrir au maximum la zone de linéarité de la gamme étalon, et de choisir en fonction la meilleure prise d'essai. L'ensemble des échantillons et la gamme étalon sont ensuite traités avec une solution d'hydrolyse contenant 40 µl de fucose à 1mg / ml, 7,65 ml d'acide trifluoroacétique (TFA) qsp 10 ml d' H₂O. L'hydrolyse est effectuée pendant 2 h à 120°C. Le fucose sert d'étalon interne, le TFA permettant d'hydrolyser totalement à chaud le polysaccharide capsulaire, et de libérer les différents monosaccharides. Après hydrolyse, les échantillons sont séchés sous flux d'azote à 40°C pendant 2 h, puis repris dans 400 µl d'eau milliQ.

Table 11. Préparation de la gamme étalon de galactose (sérotypes 4, 8, 20 et 33F). Vol., volume et Conc., concentration.

Vol. Gal. à 40 µg / ml (µl)	0	0	0	0	20	30	40
Vol. Gal. à 10 µg / ml (µl)	0	10	20	40	0	0	0
Vol H₂O (qsp 400 µl) (µl)	400	390	380	360	380	370	360
Conc. Gal. (µg / ml)	0	0,25	0,5	1	2	3	4
Vol. Gal. Injecté (µl)	100	100	100	100	100	100	100
Quantité Gal. injecté (µg)	0	0,025	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4

Table 12. Préparation de la gamme étalon d'acide glucuronique (sérotipe 5). Vol., volume et Conc., concentration.

Vol. Ac. Glucuronique à 10 µg / ml (µl)	0	0	0	0	40	80	120	160	200
Vol. Ac. Glucuronique à 1µg / ml (µl)	0	50	100	200	0	0	0	0	0
Vol. H₂O (qsp 400µl) (µl)	400	350	300	200	360	320	280	240	200
Conc. Ac. Glucuronique. (µg / ml)	0	0,125	0,25	0,5	1	2	3	4	5
Vol. Ac. Glucuronique injecté (µl)	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Quantité Ac. Glucuronique injecté (µg)	0	0,0125	0,025	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5

III.3.3.2 Sérotype 5

Pour ce sérotype, le sucre spécifique à doser est l'acide glucuronique (table 12). Une gamme étalon d'acide glucuronique est préparée à partir d'une solution d'acide glucuronique à 0,1 mg / ml :

- ✓ Préparation d'une solution à **10 µg / ml** : dilution au 1/10 → 0.1 ml qsp 1ml H₂O
- ✓ Préparation d'une solution à **1 µg / ml** : dilution au 1/100 → 0.01 ml qsp 1ml H₂O

Les échantillons sont préparés de la même manière que précédemment avec trois prises d'essais de 25 µl, 50µl et 100 µl, mais directement séchés sous flux d'azote à 40°C pendant 2 h. L'hydrolyse des échantillons et de la gamme étalon est cette fois-ci réalisée en deux étapes, avec une première étape de méthanolyse (liaisons covalentes plus fortes dans ce polyside). La méthanolyse consiste en l'ajout sur les échantillons secs de 500 µl d'un mélange méthanol 78 % / acétyl chloride 22 % (v/v), placé ensuite à 80°C pendant une nuit. L'ensemble est ensuite séché à nouveau sous flux d'azote à 40°C pendant 2 h. Après reprise dans 400 µl d'eau milliQ, on effectue la même hydrolyse en TFA décrite pour les autres sérotypes.

III.3.4 HPAEC-PAD

La quantification des monosaccharides caractéristique des polysaccharides pneumococciques est réalisée par une chromatographie haute performance d'échange d'anions, couplée à une détection ampérométrique pulsée (HPAEC-PAD). Le tampon d'élution utilisé pour l'analyse étant très basique, le pH de la solution dépasse le pKa des sucres et provoque la transformation des groupements alcools en groupements anioniques (R-OH → R-O⁻). Les composés sont séparés par échange d'anions sur la colonne contenant une résine en polystyrène-divinyl-benzène, où chaque bille est recouverte de micro particules de latex greffées avec des groupements ammonium quaternaire.

Table 13. Schéma d'élution pour l'analyse du galactose (sérotypes 4, 8, 20 et 33F).

Temps (min)	Débit (ml.min ⁻¹)	Eluant A (%)	Eluant B (%)	Eluant D (%)	Commentaires
Initial	1	100			Début analyse
0	1	100			
15	1	100			
18	1		100		
30	1		70	30	
35	1		70	30	Fin analyse
36	1	100			Ré- équilibration
70	1	100			

Table 14. Schéma d'élution pour l'analyse de l'acide glucuronique (sérotipe 5).

Temps (min)	Débit (ml.min ⁻¹)	Eluant A (%)	Eluant B (%)	Eluant C (%)	Eluant C (%)	Commentaires
Initial	1	100	*			Début analyse
0	1	100	*			
15	1	100	*			
20	1			100		
30	1			70	30	
35	1			70	30	Fin analyse
36	1	100	*			Ré- équilibration
60	1	100	*			

* la voie B prend le relais après épuisement de la voie A.

Les sucres sont oxydés sur une électrode d'or générant des électrons, provoquant ainsi une différence de potentiel mesurée par rapport à une électrode référence. Pour éviter l'encombrement de l'électrode en or par des composés oxydés, une vague de potentiels électriques est appliquée après mesure pour les décrocher (ampérométrie pulsée).

Le système HPLC utilisé est un système Dionex DX600 comprenant une pompe haute pression (Dionex GP50-2), un détecteur électrochimique avec cellule ampérométrique (Dionex ED50A), un module de chromatographie (Dionex AS50-TC) et un passeur d'échantillons (Dionex AS50). La colonne analytique utilisée est une colonne de CARBOPAC (Dionex PA-1 4x25mm) couplée à une précolonne (Dionex PA-1 4x50mm).

Pour l'analyse du galactose, les éluants utilisés sont les suivants (gradient table 13) :

- ✓ Voie A : 18 mM NaOH → 1,9 ml NaOH 46-48% qsp 2 l H₂O milli Q
- ✓ Voie B : 100 mM NaOH → 5,3 ml NaOH 46-48% qsp 1 l H₂O milli Q
- ✓ Voie C : H₂O milli Q (pour rinçages du système)
- ✓ Voie D : 100 mM NaOH + 1 M ACONa → 136 g ACONa + 5,3 ml NaOH 46-48% qsp 1 l H₂O milli Q

Pour l'analyse de l'acide glucuronique, les éluants utilisés sont les suivants (gradient table 14) :

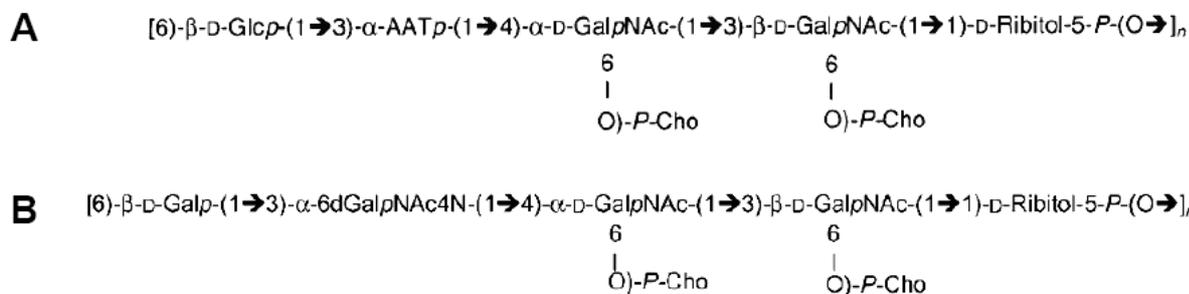
- ✓ Voie A et B: 18 mM NaOH → 1,9 ml NaOH 46-48% qsp 2 l H₂O milli Q
- ✓ Voie C : 100 mM NaOH → 5,3 ml NaOH 46-48% qsp 1 l H₂O milli Q
- ✓ Voie D : 100 mM NaOH + 1 M ACONa → 136 g ACONa + 5,3 ml NaOH 46-48% qsp 1 l H₂O milli Q

Table 15. Préparation de la gamme étalon de polyside C Staten.

Vol. Staten à 50 µg / ml (µl)	0	0	0	0	16	24	32	40
Vol. Staten à 10 µg / ml (µl)	0	10	20	40	0	0	0	0
Vol. H ₂ O (qsp 400 µl) (µL)	400	390	380	360	384	376	268	260
Conc. Staten. (µg / ml)	0	0.25	0.5	1	2	3	4	5
Vol. Staten. Injecté (µl)	100	100	100	100	100	100	100	100
Quantité Staten injecté (µg)	0	0.025	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5

Table 16. Schéma d'éluion pour l'analyse du polyside C.

Temps (min)	Débit (ml.min ⁻¹)	Eluant B (%)	Eluant D (%)	Commentaires
Initial	1	100		Début analyse
0	1	100		
10	1	100		
14	1	70	30	Régénération
15	1	70	30	
15,1	1	100		Ré-équilibrage
35	1	100		Fin analyse

**Figure 28.** Structure de l'unité répétée du polyside C de *S. pneumoniae*. A, tous les sérotypes à l'exception du 5, et B, sérotype 5. D'après Talaga *et al.*, 2001.

III.3.5 Calcul de la concentration en polysaccharide capsulaire (CPS)

A partir de la quantité en sucre caractéristique donnée par l'appareil, le calcul de la concentration en polysaccharide capsulaire est donné par la formule suivante :

$$[CPS] (\mu\text{g}/\text{ml}) = \frac{\text{quantité sucre caractéristique} \times 4 \times \text{facteur de dilution} \times 1000}{\% \text{ théorique en sucre caractéristique} \times \text{prise d'essai}}$$

III.4 Dosage des acides teichoïques ou polyoside C

Le dosage du polyoside C fait référence à une deuxième technique développée par Philippe Talaga au sein du Département Recherche Biochimie de Sanofi-Pasteur (Talaga *et al.*, 2001). Le principe est le même que la technologie développée pour le polysaccharide capsulaire, la quantification étant cette fois-ci obtenue par le dosage d'un oligosaccharide caractéristique (fourni par le Staten Serum Institute).

Je tiens à préciser que le sérotype 5 présente une variabilité dans la structure de son polyoside C, comme présenté en figure 28. Mon choix s'est porté vers cette technique pour les mêmes raisons que celles mentionnées pour le polysaccharide capsulaire (paragraphe précédent). Les échantillons prélevés en culture sont traités et dialysés de la même manière.

III.4.1 Hydrolyse des échantillons et de la gamme étalon

La gamme étalon est réalisée avec un polyoside C de *S. pneumoniae* fourni par la société Staten, et la concentration a été vérifiée (525 $\mu\text{g}/\text{ml}$) :

- ✓ Préparation d'une solution à **50 $\mu\text{g} / \text{ml}$** : 50 μl de Staten qsp 525 μl **H₂O**
- ✓ Préparation d'une solution à **10 $\mu\text{g} / \text{ml}$** : 20 μl de Staten qsp 1050 μl **H₂O**

Les mêmes prises d'essais que celles décrites précédemment ont été utilisées pour ce dosage. Les échantillons sont séchés puis hydrolysés avec 400 µl d'une solution d'acide hydrofluorhydrique (HF) contenant 48 µl de fructose (étalon interne) à 1 mg / ml qsp 20 ml de HF 48%. L'hydrolyse est réalisée pendant 48 h à 4°C. Les tubes sont ensuite séchés, puis repris dans 400 µl d'eau milliQ pour analyse.

III.4.2 HPAEC-PAD

Le matériel HPLC est identique à celui utilisé pour le dosage du polysaccharide capsulaire. Seuls les tampons et la séquence d'élution sont différents : pour l'analyse de l'acide glucuronique, les éluants utilisés sont les suivants :

- ✓ Voie A : H₂O milli Q
- ✓ Voie B : 75mM NaOH → 7.95 ml NaOH 46-48% qsp 2 l H₂O milli Q
- ✓ Voie C : H₂O milli Q
- ✓ Voie D : 100 mM NaOH + 1 M ACONa → 136 g ACONa + 5,3 ml NaOH 46-48% qsp 1 l H₂O milli Q

Le schéma d'élution est détaillé dans la table 16.

III.4.3 Calcul de la concentration en acides teichoïques

Pour tous les sérotypes à l'exception du sérotype 5, la formule à appliquer est la suivante :

$$[C-PS] (\mu\text{g}/\text{ml}) = \frac{\text{quantité oligosaccharide caractéristique} \times 4 \times \text{facteur de dilution} \times 1000}{\text{prise d'essai}}$$

Pour le sérotype 5, la réponse de l'oligosaccharide n'est pas identique à celle du C-PS Staten. Un facteur de correction doit être pris en compte, la formule devenant :

$$[C - PS] (\mu\text{g} / \text{ml}) = \frac{\text{quantité oligosaccharide caractéristique} \times 4 \times \text{facteur de dilution} \times 1000}{\text{prise d'essai} \times 0,70}$$

III.5 Analyse de la taille du polysaccharide capsulaire

Il s'agit là encore d'une technologie développée par Philippe Talaga au sein du Département Recherche Biochimie de Sanofi-Pasteur, répondant aux exigences de production sur la qualité du produit. Le principe est basé sur une technologie HPSEC (high performance size exclusion chromatography) couplée à un analyseur multi-détection, comprenant notamment un viscosimètre fonctionnant par différentiel de pression. Le pic obtenu grâce à ce détecteur permet, par comparaison avec des solutions standards de viscosité connue, une estimation de la taille du polysaccharide capsulaire. Les échantillons utilisés pour cette analyse sont les mêmes que ceux utilisés pour les différents dosages Dionex, à la seule différence qu'il n'est pas nécessaire de les dialyser.

III.5.1 HPSEC

Le système utilisé pour ces analyses est une chaîne chromatographique à triple détection Viscotek, combinant un réfractomètre, un détecteur de diffusion de la lumière et un viscosimètre. Les colonnes gel filtration utilisées sont de type TSK G6000PWXL et TSK G4000PWXL (Viscotek) montées en série. Le tampon utilisé comme phase mobile est un tampon Na_2PO_4 0,2 M pH 6,9, réglé à un débit de 0,75 ml/min, les colonnes et le système de détection étant maintenus à une température de 30°C. Le volume d'injection de l'échantillon est de 100 μl , et le temps d'analyse de 60 min.

III.5.2 Détermination de la taille du polysaccharide capsulaire

L'estimation de la taille du polysaccharide capsulaire est réalisée par la détermination du coefficient de partition KD dont la formule est la suivante :

Table 17. Spécifications KD pour la libération des lots de *S. pneumoniae*. Données Sanofi-Pasteur.

Sérotype	Spécifications de tailles Moléculaires (KD)
1	≤ 0,15
2	≤ 0,15
3	≤ 0,15
4	≤ 0,15
5	≤ 0,60
6B	≤ 0,50
7F	≤ 0,20
8	≤ 0,15
9N	≤ 0,20
9V	≤ 0,45
10A	≤ 0,65
11A	≤ 0,40
12F	≤ 0,25
14	≤ 0,30
15B	≤ 0,55
17F	≤ 0,45
18C	≤ 0,15
19A	≤ 0,45
19F	≤ 0,20
20	≤ 0,60
22F	≤ 0,55
23F	≤ 0,15
33F	≤ 0,50

$$KD = \frac{(VE - V0)}{(VT - V0)}$$

VE : volume d'éluion de l'échantillon

VT : volume d'éluion d'ADN de très haut poids moléculaire à 20 µg/ml (volume mort de la colonne)

V0 : volume d'éluion d'une solution de saccharose à 10 mg/ml (volume total de la colonne)

Le coefficient de partition est inversement proportionnel à la taille du polysaccharide capsulaire. Plus ce coefficient est faible, plus la taille du polysaccharide est importante. Les valeurs obtenues permettent ainsi d'évaluer la qualité du produit directement en cours de culture, vis-à-vis des spécifications données pour la libération des lots en production industrielle. Les spécifications de KD pour chacun des sérotypes composant le vaccin Pneumo 23 sont précisées en table 17.

IV. Dosage des métabolites intracellulaires

Ce dosage permet de mesurer l'accumulation d'intermédiaires métaboliques, et par conséquent de caractériser l'état de saturation des activités enzymatiques.

IV.1 Prélèvements et extractions

Le dosage des métabolites intracellulaires est basé sur l'arrêt rapide du métabolisme, suivi d'une extraction optimale et non dégradative des métabolites (Le Bloas P., 1993). Afin de figer le métabolisme, 15 ml de culture sont plongés immédiatement dans de l'azote liquide puis stockés à - 80°C jusqu'à l'extraction. Aucune étape préliminaire de concentration et/ou de lavage des cellules n'est réalisée.

Le protocole d'extraction choisi est basé sur une méthode développée pour les bactéries produisant des exopolysaccharides (Letisse et Lindley, 2000). Le choix s'est porté plus précisément sur une extraction à l'éthanol froid, afin de répondre aux contraintes de sécurité de Sanofi-Pasteur. Toutes les extractions concernant les souches pathogènes ont été directement réalisées en zone P3. Approximativement 5 ml d'échantillon sont versés dans un tube préparé contenant une solution d'éthanol (75% v/v) et de tampon HEPES 70 mM, pH 7,5 (25% v/v), préalablement refroidi à -80°C. Les tubes sont agités vigoureusement. Cette étape permet non seulement l'arrêt et l'inactivation du métabolisme, mais aussi la libération des métabolites. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation (12 000 rpm, 4°C, 8 min), puis les tubes sont stockés à -80°C avant les étapes de purification.

IV.2 Purification des métabolites intracellulaires

La purification est réalisée à l'aide de colonnes de chromatographie d'échange d'anions forts (500 mg isolute SAX, réservoir de 6 ml, Supelco). Après activation de la colonne par passage successifs de 9 ml d'éthanol pur, de 9 ml d'acétate de sodium 1M, de 9 ml d'acide acétique 0,5 M et de 3 ml d'eau distillée, l'échantillon est déposé et élué par gravimétrie. Après un lavage par 9 ml de méthanol à 20% (v/v), 2 ml d'acétate de sodium

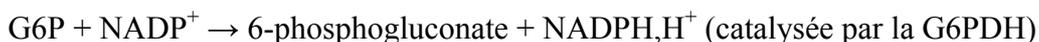
permettent de récupérer les métabolites dans des tubes à hémolyse préparés. Cette purification est réalisée à 4°C, et peut être appliquée pour la purification du G6P, G1P, F6P, FDP, PEP, DHAP et GAP (Letisse et Lindley, 2000).

IV.3 Dosage des métabolites intracellulaires

Le dosage *in vitro* des concentrations intracellulaires des intermédiaires métaboliques met en jeu des réactions enzymatiques, couplées à une détection fluorimétrique de l'oxydation ou de la réduction de NAD(H, H⁺) ou de NADP(H, H⁺). Les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de fluorescence du NAD(P)H, H⁺ sont respectivement de 350 nm et de 460 nm. Les dosages fluorimétriques sont réalisés à l'aide d'un spectrofluorimètre Perkin-Elmer LS 50 B, muni d'une lampe au Xénon.

IV.3.1 Dosage du G6P, du F6P et du G1P

Les réactions impliquées dans le dosage sont les suivantes :



Le mélange réactionnel (1 ml) contient :

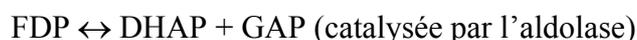
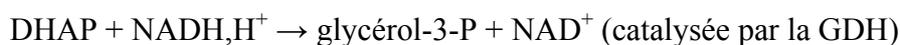
✓ Tampon triéthanolamine 500 mM + MgSO ₄ 15 mM, pH 7,6	200 µl
✓ NADP ⁺ 10 mM	20 µl
✓ Extrait à doser	400 µl
✓ Eau milliQ	380 µl

Le dosage du G6P est réalisé en ajoutant 10 µl de glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PdH) à 200 U/ml. La quantité de NADPH, H⁺ produite est égale à la concentration de G6P dans l'essai. La conversion de F6P en G6P est ensuite initiée par addition de 10 µl de phosphogluucose isomérase (PGI) à 200 U/ml, le NADPH, H⁺ produit

étant égal à la concentration de F6P. La concentration en G1P est dosée en ajoutant 10 µl de phosphoglucomutase (PGM) à 200 U/ml. La quantité de NADPH,H⁺ produite est égale à la concentration de G1P.

IV.3.2 Dosage du FDP, du GAP et du DHAP

Les réactions impliquées dans le dosage sont les suivantes :



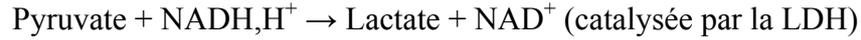
Le mélange réactionnel (1 ml) contient :

✓ Tampon Triéthanolamine 500 mM + MgSO ₄ 15 mM, pH 7	200 µl
✓ NADH,H ⁺ 0,5 mM	80 µl
✓ Extrait à doser	400 µl
✓ Eau milliQ	320 µl

La teneur en DHAP dans l'essai est déterminée en ajoutant 10 µl de glycérophosphate déshydrogénase (GDHase) à 500 U/ml. La quantité de NADH,H⁺ consommée est égale à la concentration de DHAP dans l'essai. La consommation du GAP est ensuite initiée par addition de 10 µl de triose-phosphate isomérase (TPI) à 5000 U/ml. La quantité de NAD⁺ produite correspond à la concentration de GAP. Enfin, le FDP est dosé en ajoutant 10 µl de fructose-1,6-diphosphate aldolase (aldolase) à 200 U/ml. La quantité de NADH,H⁺ consommée correspond au double de la concentration de FDP dans l'essai.

IV.3.3 Dosage du PEP et du pyruvate (pyruvate non récupéré sur colonne)

Les réactions impliquées dans le dosage sont les suivantes :



Le mélange réactionnel (1 ml) contient :

✓ Tampon phosphate (KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ 500 mM) + MgCl ₂ 12,5 mM, pH 7	200 µl
✓ NADH,H ⁺ (0,5 mM)	80 µl
✓ ADP (100 mM)	40 µl
✓ Extrait à doser	75 µl
✓ Eau milliQ	605 µl

La teneur en pyruvate est déterminée en ajoutant 20 µl de lactate déshydrogénase (LDH). La quantité de NADH,H⁺ oxydée est alors égale à celle du pyruvate dans l'essai. La conversion du PEP en pyruvate est obtenue en ajoutant 20 µl de pyruvate kinase (PYK) à 1000 U/ml. La variation de fluorescence correspond à la quantité de PEP contenue dans l'extrait.

IV.3.4 Calcul des concentrations intracellulaires des métabolites

Lors du dosage des intermédiaires métaboliques, les enzymes sont ajoutées deux fois, la première fois pour consommer le métabolite et donc mesurer la variation de fluorescence associée (ΔF), et la seconde pour connaître la valeur de la fluorescence propre de l'enzyme (ΔF_E), afin de la soustraire à la fluorescence de la réaction. La quantification se fait par ajout systématique, à la fin de chaque dosage, d'un étalon interne de NADH ([Etalon], 5 à 10 µM), conduisant à une variation de fluorescence ΔF_{Etalon} . Ainsi, la concentration C_m (µM) du métabolite m dans la cuve est calculée par la relation :

$$C_m = a \times \frac{\Delta\Delta F - \Delta\Delta F_E}{\Delta F_{\text{Etalon}}} \times [\text{Etalon}]$$

a est le coefficient stœchiométrique reliant le métabolite au NAD(P)H

La concentration intracellulaire du métabolite Cic ($\mu\text{mol.g}^{-1}$) est alors donnée par la relation (en assumant que le volume intracellulaire est constant) :

$$\text{Cic} = \text{Cm} \times \frac{\text{D1} \times \text{D2}}{\text{X}}$$

D1 : facteur de dilution de l'extrait dans l'essai enzymatique

D2 : facteur de dilution de la culture lors de l'extraction

X : concentration en biomasse du prélèvement (g.l^{-1})

Pour chaque temps de prélèvement, six extractions ont été réalisées afin de valider la reproductibilité de la manipulation. Pour chaque dosage, trois mesures sont effectuées afin d'estimer l'erreur moyenne sur la mesure, correspondant à l'écart-type.

V. Analyse de l'expression des gènes

L'analyse de l'expression des gènes a été réalisée en utilisant deux types de technologies. Dans un premier temps, celle-ci a été effectuée en utilisant des puces à ADN de type lames de verre, ce qui permet une analyse globale à l'échelle du génome et par conséquent un criblage des gènes d'intérêt. Par la suite, la technologie de RT-PCR quantitative a été utilisée pour confirmer les tendances obtenues par puces à ADN, et quantifier plus précisément les niveaux d'expression de ces gènes d'intérêt filtrés.

V.1 Extraction et quantification de l'ARN total

Un volume de culture correspondant à 6 mg de cellules est prélevé, et directement congelé dans l'azote liquide (5 aliquots de culture sont systématiquement recueillis). Les échantillons sont conservés à -80 °C jusqu'au cassage des cellules. L'extraction de l'ARN total est réalisée au moyen du kit de purification RiboPure™-Bacteria (Ambion). Cette extraction est de type phénol-chloroforme : elle combine un cassage mécanique et chimique adapté aux bactéries Gram-positives capsulées. La seule préconisation à préciser est le temps de cassage qui s'avère critique pour la qualité de l'extraction. Ce temps de cassage a été standardisé à 15 min pour l'ensemble des extractions. Un traitement DNase (fourni dans le kit) est inclus dans la procédure d'extraction, permettant d'éviter des contaminations par l'ADN génomique. L'ARN total obtenu est quantifié dans un premier temps par mesure de l'absorbance à 260 nm (DO_{260nm}), après dilution adéquate de l'ARN dans de l'eau stérile pour rester dans la gamme de linéarité du spectrophotomètre ($DO < 0,6$). La concentration d'ARN ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) est obtenue grâce à la relation suivante :

$$[\text{ARN}] = DO_{260nm} \times 0,04 \times \text{facteur de dilution}$$

La concentration d'ARN est également exprimée relativement à la biomasse :

$$[\text{ARN}]_x = \frac{[\text{ARN}] \times V_{\text{élution}} \times 10^{-6} \times 2}{6 \times 10^{-3}} \times 100$$

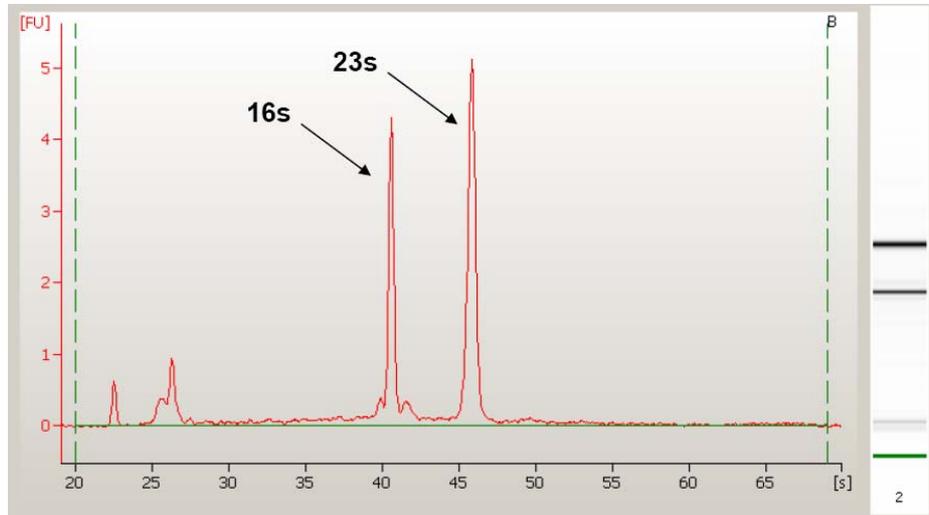


Figure 29. Profil type d'ARN de *S. pneumoniae* obtenu avec l'Agilent Bioanalyzer. A droite, l'électrophorogramme.

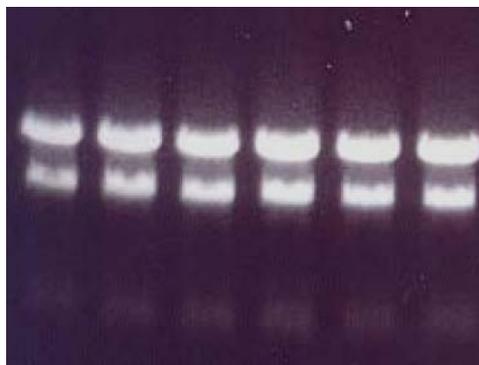


Figure 30. Electrophorèse d'ARNs totaux de *S. pneumoniae*, réalisée en conditions dénaturantes.

$[ARN]_X$ est la concentration cellulaire d'ARN total en $g \cdot 100g^{-1}$ de masse sèche, et $V_{\text{élution}}$ est le volume après élution en μl . La pureté de l'ARN est vérifiée par mesure de l'absorbance à 280 nm ($1,8 < DO_{260nm} / DO_{280nm} < 2$). Dans un deuxième temps, la quantité et la qualité des ARNs sont aussi validées par électrophorèse capillaire au moyen d'un Agilent Bioanalyzer dont dispose la Plateforme Biopuces de l'INSA Toulouse (figure 29). L'intégration des pics par l'appareil permet le calcul du RIN (RNA integrity number), ce coefficient devant être supérieur ou égal à 7 pour assurer un ARN de bonne qualité (Schroeder *et al.*, 2006).

Enfin, un gel d'électrophorèse est réalisé en conditions dénaturantes (figure 29). Un volume d'ARN équivalent à 2 μg est incubé pendant 15 min à 65 °C avec 5 μl de solution dénaturante (MESA 1,3 X, 21 % (V/V) formaldéhyde 37 %, 64 % (V/V) formamide, BET 0,17 $mg \cdot ml^{-1}$), puis rapidement refroidi dans la glace. L'échantillon est déposé avec 1,5 μl de tampon de charge (tampon Na-phosphate (10 mM, pH 7), bleu de bromophénol 2 $g \cdot l^{-1}$) sur un gel d'agarose (1 % P/V) contenant 3,3 % (V/V) de formaldéhyde 37 % et 10 % (V/V) de MESA 10 X. La migration est réalisée à 4 °C dans un tampon MESA 1 X pendant 30 min à 100 V. Notons que les rendements et la qualité des ARNs totaux obtenus n'ont pas varié de façon significative selon les différents temps d'extraction utilisés, ce qui nous a permis de nous affranchir de mécanismes de dégradation potentiels.

V.2 Analyse globale de l'expression des gènes par puces à ADN (microarrays)

V.2.1 Lames Eurogentec *S. pneumoniae* TIGR 4

Les puces à ADN utilisées pour l'ensemble des analyses globales sont des lames de verres fournies par Eurogentec, sur lesquelles sont spottés 2085 produits PCR spécifiques des ORFs de la souche *S. pneumoniae* TIGR4 (Tettelin *et al.*, 2001), ce qui représente 99 % des séquences codantes identifiées dans le génome (2105). Toutes les cibles PCRs sont spottées en dupliquas. Ce travail ayant été réalisé avec plusieurs sérotypes de *S. pneumoniae*, des essais préliminaires ont permis de valider la possibilité d'hybrider les lames de la souche TIGR4 avec des acides nucléiques provenant des isolats cliniques utilisés, en ne tenant pas

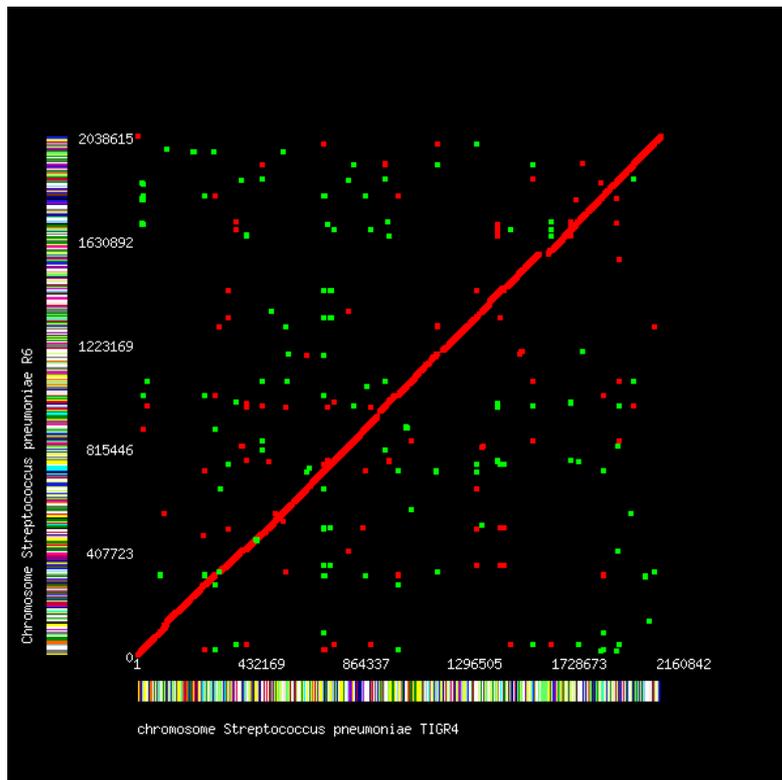


Figure 31. Alignement de génomes effectué grâce au logiciel Mummer (<http://cmr.tigr.org>). D'après Delcher *et al.*, 2002. En abscisse est représenté le génome de la souche TIGR4, et en ordonnées celui la souche R6 (les couleurs indiquant les différentes fonctions des gènes). En rouge, les alignements ayant une même orientation et en vert, ceux ayant une orientation opposée.

compte lors du traitement des résultats des gènes qui diffèrent (certains gènes de l'opéron capsulaire). L'alignement des génomes de la souche R6 (dérivée du type 2) et de la souche TIGR4, grâce au logiciel d'alignement Mummer (Delcher *et al.*, 2002), montre en effet qu'il y a très peu de variabilité entre ces deux génomes (figure 31).

V.2.2 Préparation des ADNc

Pour un marquage, le mix de rétrotranscription présente la composition suivante :

- ✓ 10 µg d'ARN
- ✓ 8 µl de 5X Buffer (Invitrogen)
- ✓ 3 µl d'un mix de dATP, dGTP, dTTP à 20 mM chacun (Invitrogen)
- ✓ 1 µl de dCTP à 1mM (Invitrogen)
- ✓ DTT 0,1 M (Invitrogen)
- ✓ 2 µl de primer specific mix de *S. pneumoniae* TIGR4 (Eurogentec)
- ✓ H₂O RNase free qsp 35,5 µl (Invitrogen)

Ce mix est incubé 5 min à 65°C puis 5 min à 42°C pour dénaturation. 1,5 µl de fluorochrome de type Cy3 ou Cy5 (Perkin-Elmer) puis 1 µl de Superscript Reverse Transcriptase II (Invitrogen) sont ensuite ajoutés. L'ensemble est incubé 1 h à 42°C, suivi d'une incubation additionnelle durant 1 h supplémentaire par rajout d'1µl de Superscript Reverse Transcriptase II. La rétrotranscription est stoppée par ajout de 2 µl de stop solution (Invitrogen) et centrifugation 10 min à 13000 rpm. Une purification des sondes obtenues est effectuée à l'aide d'un kit Label Star array (Qiagen). Le mélange d'amorces spécifiques fourni par Eurogentec permet d'assurer une efficacité optimale de la rétrotranscription, en permettant une sélectivité préférentielle sur les ARNm par rapport aux ARNr ou aux ARNt. Une vérification de la qualité du marquage est effectuée au moyen d'un Nanodrop ND-1000, qui permet de vérifier le niveau d'incorporation de chaque fluorochrome. Après cette dernière étape, les deux marquages correspondant à une condition sont poolés puis stockés à 4°C en attente d'hybridation.

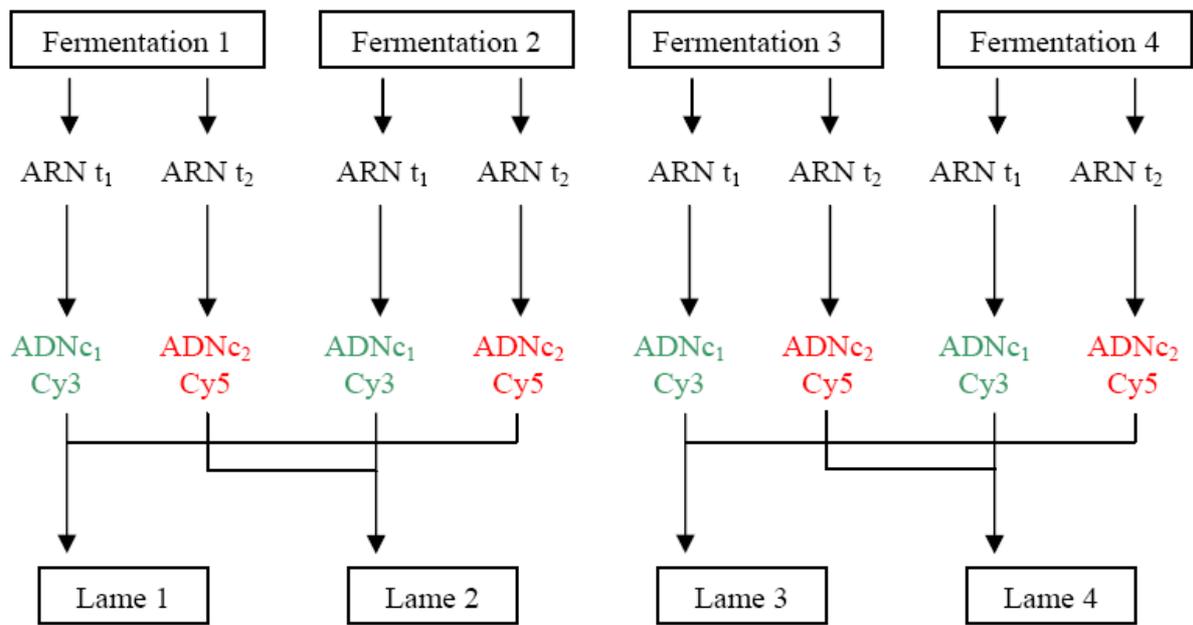


Figure 32. Représentation schématique du plan d'expérience adopté pour la comparaison de 2 temps de culture de *S. pneumoniae*.

V.2.3 Préhybridation, hybridation et détection

Cette étape entièrement automatisée est réalisée au moyen d'un Ventana (Discovery) disponible auprès de la Plateforme Biopuces de Toulouse. L'appareil permet de réaliser jusqu'à 20 puces à ADN simultanément, en assurant une homogénéisation de l'hybridation sur l'ensemble de la lame. Afin d'optimiser la qualité de l'hybridation, une préhybridation est réalisée en utilisant une solution de BSA 1 % qui assure une saturation du support de spotting, et favorise ainsi la spécificité de l'hybridation. L'hybridation est réalisée dans un tampon d'hybridation Chip Hyb pendant 8 h à 42°C. Suite à l'hybridation, les lames sont lavées dans deux bains successifs de tampon Ribowash (Ventana Medical System) puis un bain de tampon 0,2 X SSC. Les lames sont ensuite séchées à l'aide d'une centrifugeuse de pailleuse, puis scannées au moyen d'un scanner Genepix Pro (Axon).

V.2.4 Plan d'expérience

Quatre cinétiques indépendantes ont été réalisées pour chaque sérotype étudié, à partir du même inoculum congelé. Pour ces différentes cinétiques de croissance, 3 points clés de la culture (deux en phase exponentielle et un en phase stationnaire) sont choisis et sont analysés simultanément depuis l'extraction d'ARN jusqu'au traitement des données. Chaque lame permettant une comparaison de deux conditions, une répétition est réalisée par inversion des fluorochromes (dye-switch). La figure 32 résume la comparaison de 2 temps de culture pour un même sérotype.

V.2.5 Traitement des données

Les images des lames sont quantifiées par S. Sokol et D. Labourdette (Plateforme Biopuces, INSA Toulouse) pour accéder à l'intensité de tous les spots. La variabilité des signaux due aux conditions expérimentales (efficacité de rétrotranscription, intensité de la fluorescence, hybridation) doit être prise en compte pour n'interpréter par la suite que des variations ayant une signification biologique. Ceci est réalisé en normalisant les données, de façon à prendre en compte les dissimilitudes techniques entre les différentes lames. La

méthode corrige l'intensité d'un spot en la divisant par l'intensité moyenne de la lame correspondante. L'intensité moyenne de la lame est représentative de la quantité d'ADNc, donc d'ARNm, dans les 10 µg d'ARN total initial. Cette méthode permet donc d'observer la proportion d'un messager au sein de la population d'ARNm, c'est-à-dire son abondance. Lorsque l'on souhaite accéder aux variations d'expression, ces valeurs normalisées sont transformées en logarithme pour permettre un traitement statistique ultérieur. Le ratio d'expression entre 2 points de culture est ensuite calculé pour chaque gène en prenant toujours le même point de référence. Les valeurs ayant été transformées en logarithme, les ratios d'expression sont obtenus pour un gène x en calculant la différence $\log I_{\text{test}} - \log I_{\text{ref}}$. La significativité de ces ratios est évaluée grâce à un test de Student fournissant une p-value. Biplot permet enfin de définir les critères de sélectivité des gènes : on considère qu'un gène a un niveau de variation si le ratio est inférieur à 0,66 ou supérieur à 1,5, avec une p-value inférieure à 0,05. Par ailleurs, une interface entre la banque de gènes TIGR et Biplot créée par S. Sokol permet de classifier l'ensemble des résultats par catégories fonctionnelles.

V.3 Analyse de l'expression des gènes par RT-PCR quantitative

V.3.1 Préparation des ADNc

10 µg d'ARN total sont dénaturés pendant 5 min à 70 °C en présence de 2 µl de primer specific mix de *S. pneumoniae* TIGR4 (Eurogentec). Après refroidissement rapide dans la glace, 1,5 µl de dATP, dGTP, dTTP et dCTP (Sigma, 10 mM chacun), 10 µl de tampon 5X (Invitrogen) et 5 µl de DTT 0,1M (Invitrogen Life Technologies) sont ajoutés, le tout incubé 5 min à température ambiante. Après ajout de 1,5 µl de Superscript Reverse Transcriptase II (Invitrogen), la rétrotranscription est réalisée pendant 1 h à 42 °C. La rétrotranscription est stoppée par incubation à 70 °C pendant 15 min. Les ARNm sont digérés par la RNase H (37 °C, 20 min, Invitrogen), et les nucléotides résiduels sont éliminés par purification sur colonne Microspin G25 (Amersham). Les ADNc sont conservés à 4 °C jusqu'à l'hybridation.

V.3.2 Design des primers

Le design des primers utilisés pour effectuer l'amplification spécifique d'un gène a été réalisé avec les logiciels Beacon Designer[®] ou Vector NTI[®]. Les caractéristiques choisies pour les primers sont une taille d'amplicon comprise entre 75 et 150 pb, un T_m proche de 60°C et une taille de primer comprise entre 20 et 30 pb. L'ensemble des primers que j'ai utilisé pour la réalisation des RT-PCR est présenté en Annexe 6.

V.3.3 PCR en temps réel

La PCR en temps réel est réalisée au moyen d'un thermocycleur couplé à un module de détection de type MyiQ RT-PCR detection system[™] (Biorad). Les réactions sont effectuées sur des plaques 96 puits, chaque puits contenant 12,5 μ l de iQ SYBR Green Supermix (Biorad), 4 μ l du mix de primers (à 5 μ M chacun), 5 μ l d'ADNc et 3,5 μ l d'H₂O. Le SYBR Green Supermix contient des nucléotides fluorescents permettant de suivre en temps réel l'amplification. La plaque est centrifugée 30 s à 5000 rpm après avoir été recouverte au préalable d'un film plastique. Le cycle de PCR utilisé est constitué d'une dénaturation primaire à 95°C pendant 3 min, suivie de 40 cycles d'amplification (95°C pendant 15 s et 60°C pendant 45 s).

V.3.4 Quantification des niveaux d'expression

La quantification des niveaux d'expression est effectuée en utilisant la méthode $\Delta\Delta Ct$ (Livak et Schmittgen, 2001), méthode utilisée de façon habituelle pour déterminer des niveaux d'expression en RT-PCRq. Le principe de cette méthode est de déterminer le C_t (cycle threshold) soit la valeur seuil de cycles nécessaire pour observer le démarrage de l'amplification. Plus la valeur du C_t est faible, plus la quantité de transcrits du gène d'intérêt est importante. Pour chaque condition analysée (test et référence), la différence de C_t obtenue entre le gène d'intérêt et un gène de référence choisi au préalable donne les valeurs $\Delta C_{t_{test}}$ et $\Delta C_{t_{ref}}$. Le $\Delta\Delta Ct$ est obtenu par la différence $\Delta C_{t_{test}} - \Delta C_{t_{ref}}$. Pour obtenir la quantification, le calcul est basé sur le fait que la quantité d'ADN doit doubler à chaque nouveau cycle de PCR,

soit après N cycles une quantité de 2^N ADN dans le cas où l'efficacité de PCR est de 100%.
Le niveau d'expression est ainsi donné par la relation :

Niveau expression = $2^{\Delta\Delta Ct}$ si l'efficacité de PCR est de 100 %.

Niveau expression = $1,9^{\Delta\Delta Ct}$ si l'efficacité de PCR est de 90 %.

L'efficacité de la PCR est directement donnée par l'appareil et tient compte de la qualité d'amplification. Sa valeur pouvant fortement impacter les niveaux d'expression obtenus, un nombre suffisant d'analyses doit être effectué pour assurer la validité des résultats. En général, chaque gène est analysé deux fois en tripliquas (chaque analyse étant elle-même composé de trois dilutions successives).

VI. Clonage et expression *in vivo*

L'ensemble des souches, plasmides et primers utilisés pour la réalisation des manipulations suivantes est présenté en Annexe 6.

VI.1 Extraction de l'ADN génomique

L'extraction d'ADN génomique de *S. pneumoniae* est réalisée à partir des mêmes échantillons utilisés pour l'extraction ARN, à savoir une quantité de départ de 6 mg de cellules. Le kit de purification utilisé est le Dneasy tissue kit (Qiagen) avec un pré-traitement au lysozyme préconisé par le fabricant pour les bactéries Gram+ capsulées. L'ADN est quantifié par mesure de l'absorbance à 260 nm (DO_{260nm}) après dilution adéquate de l'ADN dans de l'eau pour rester dans la gamme de linéarité du spectrophotomètre ($DO < 0,6$). La concentration d'ADN ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) est obtenue grâce à la relation suivante :

$$[\text{ADN}] = DO_{260nm} \times 0,05 \times \text{facteur de dilution}$$

La pureté de l'ADN est vérifiée par mesure de l'absorbance à 280 nm ($1,8 < DO_{260nm} / DO_{280nm} < 2$).

VI.2 PCR

L'ensemble des amplifications par PCR a été réalisé en utilisant la DNA polymérase Dynazyme™ (Finnzymes). Le design des primers a été effectué avec les mêmes logiciels utilisés précédemment. Le mix classique de PCR a la composition suivante :

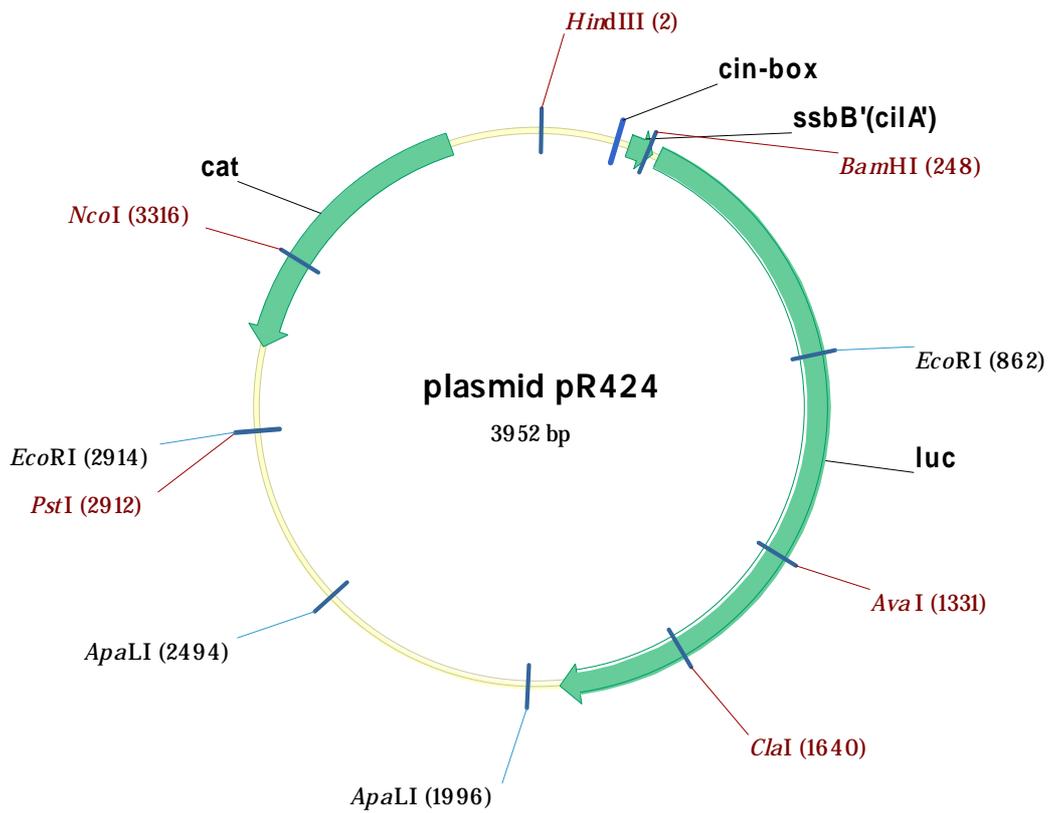


Figure 33. Organisation génétique du plasmide pR424. Les flèches vertes représentent les différents ORFs.

- ✓ 1 µl de matrice ADN
 - ✓ 0,5 µl de chaque primers
 - ✓ 4 µl de dNTP mix (10 mM chacun)
 - ✓ 0,5 µl de Dynazyme
 - ✓ Tampon 5X (Finnzymes)
 - ✓ 38,5 µl d'H₂O
- L'ajout de MgSO₄ est effectué
si nécessaire.

Le cycle PCR standard utilisé comporte une étape de dénaturation initiale de 5 min à 94°C, 30 cycles d'amplification (94°C pendant 30 s, 55°C pendant 30 s et 72°C pendant 45 s) et une élongation finale à 72°C pendant 45 s. Les fragments utilisés sont purifiés sur gel en utilisant le kit QIAquick gel extraction de Qiagen.

VI.3 Vecteurs

Le vecteur utilisé au cours des différentes stratégies de clonage de *S. pneumoniae* est le vecteur intégratif pR424(Chastanet *et al.*, 2001), plasmide présentant un gène de résistance au chloramphénicol, et le gène reporter luciférase provenant de *Photinus pyralis* (luciole). Ce vecteur a été fourni par l'équipe de Jean-Pierre Claverys (Laboratoire de Microbiologie et de Génétique Moléculaire). L'ensemble des insertions avec ce plasmide a été effectué entre les sites *Hind*III et *Bam*HI, ce qui permet de générer différentes fusions transcriptionnelles. La figure 33 présente l'organisation génétique de ce plasmide. L'ensemble des fusions générées avec ce plasmide est répertorié en Annexe 6.

VI.4 Mutagenèse du site *cre* et mutation du gène *ccpA*

La mutagenèse dirigée du site *cre* potentiel identifié en amont de l'opéron *cps* a été réalisée par PCR en utilisant comme matrice le fragment amplifié par les primers *cpsF* et *cpsR* (Annexe 6). Deux PCR sont réalisées sur ce fragment, en utilisant la paire *cremut1* / *cpsR* puis la paire *cremut2* / *cpsF* (Annexe 6). Les deux produits PCR qui contiennent la séquence *cre* mutée sont utilisés ensemble comme matrice pour une dernière PCR, permettant d'allonger la séquence de chaque côté du site via les primers *cpsF* et *cpsR*. Le fragment

obtenu contenant le site muté est ensuite inséré dans le vecteur pR424 pour transformation. De plus, le design des primers utilisés pour la mutagenèse du site *cre* permet d'insérer un site de restriction (permettant une vérification de la construction). La mutation du gène *ccpA* est réalisée pour sa part en utilisant comme matrice un fragment de 2026 pb recouvrant largement le gène, obtenu par amplification d'ADN chromosomique de la souche R6 avec les primers *ccpA1* et *ccpA2* (Annexe 6). Une mutagenèse aléatoire est ensuite effectuée en utilisant la transposase *mariner*, ce qui provoque des insertions aléatoires dans le gène cible (Prudhomme *et al.*, 2007).

VI.5 Transformation

La transformation de *S. pneumoniae* avec les différentes constructions obtenues est réalisée à 37°C en présence du peptide inducteur de la compétence (CSP) pendant 2 h. La sélection des transformants s'effectue sur milieu CAT / agar supplémenté de 4 % de sang défibriné de cheval, puis dépôt de 10 ml CAT / agar supplémentaire contenant 4,5 µg/ml de chloramphénicol. Les transformants ainsi sélectionnés sur boîte sont ensuite vérifiés par PCR sur colonie puis par séquençage de la zone d'insertion (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004).

VI.6 Analyse de l'expression *in vivo*

L'analyse des niveaux d'expression *in vivo* est réalisée au moyen des différentes fusions réalisées comme décrit précédemment (gène luciférase). Le suivi en temps réel de l'activité luciférase est réalisé au moyen d'un luminomètre LucyI (Anthos), permettant de mesurer en parallèle la DO à 492 nm. Les cultures sont réalisées sur des plaques 96 puits à fond transparent (Corning), chaque puits contenant 276 µl de milieu, 20 µl de luciférine (0,66 mM) et 4 µl de cellules. La luminescence est exprimée en RLU (relative luminescence unit), à savoir la luminescence brute ramenée à la DO afin d'avoir une luminescence spécifique (Prudhomme et Claverys, 2007).

VII. Outils statistiques et bioinformatiques

Les différents programmes et interfaces Web utilisés au cours de cette étude pour obtenir et manipuler les séquences nucléotidiques, ou encore le traitement des puces à ADN, sont listés ici.

- ✓ **Bioplot** : traitement des données de puces à ADN, plateforme Biopuces de Toulouse (<http://biopuce.insa-toulouse.fr/>)
- ✓ **Vector NTI[®]** : logiciel de traitement de séquences nucléotidiques, design d'amorces et alignement de séquences. La recherche de sites *cre* potentiels dans les génomes des souches R6 et TIGR4 a été effectuée via l'utilisation de ce logiciel, en rentrant la séquence consensus de *B. subtilis* TGWNANCGNTNWCA dans le moteur de recherche de motifs.
- ✓ **Beacon designer[®]** : logiciel de design de primers
- ✓ **Multalin** : interface web d'alignement de séquences de l'INRA (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>)
- ✓ **Genbank** : banque de données de séquences (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>)
- ✓ **TIGR** : banque de données de séquences (<http://www.tigr.org/>)
- ✓ **KEGG** : banque de référencement des voies métaboliques (www.genome.jp/kegg/)
- ✓ **NCBI Blast** : alignement et blast de séquences (<http://130.14.29.110/BLAST/>)

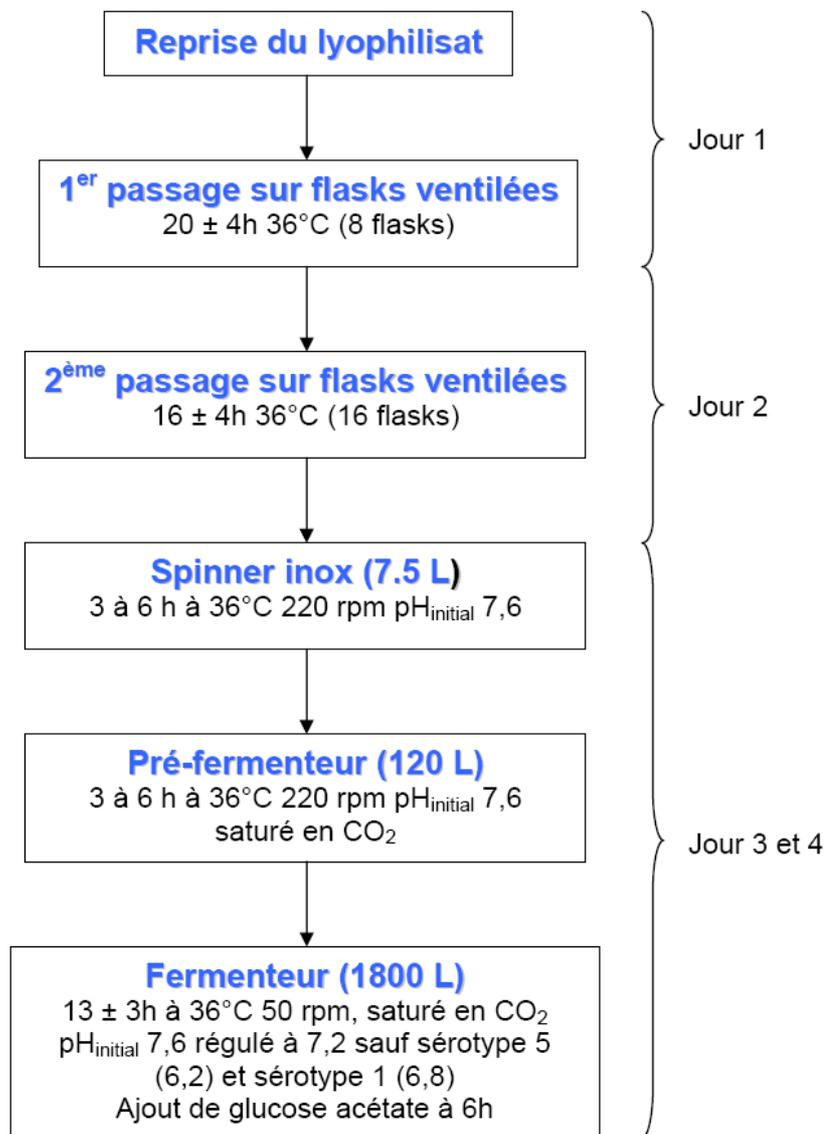


Figure 34. Diagramme de production du procédé Pneumo 23 pour la partie culture cellulaire. Données Sanofi-Pasteur.

VIII. La production de polysaccharide capsulaire de *S. pneumoniae* chez Sanofi-Pasteur

Cette dernière partie du chapitre Matériel et Méthodes décrit les grandes lignes du procédé de production du vaccin Pneumo 23, produit par Sanofi-Pasteur. En effet, il est important de contextualiser cet exposé à l'environnement industriel, étant donné que la thématique initiale de ce travail est de mieux comprendre le comportement physiologique des différents sérotypes de *S. pneumoniae* en production.

VIII.1 Principe général

Comme déjà abordé dans le chapitre I, les vaccins multivalents de *S. pneumoniae* sont apparus dès le début des années 70 pour répondre aux problèmes de résistance aux antibiotiques. Le procédé utilisé chez Sanofi-Pasteur a fait l'objet d'un brevet, déposé en 1983. Ce brevet concerne préférentiellement la partie purification de l'antigène, la partie fermentation n'étant soumise à aucune protection particulière (Arminjon et Donikian, 1983). Comme l'ensemble des vaccins produits par Sanofi-Pasteur, le procédé de production est divisé en trois parties principales : la culture des cellules, la récolte, et la purification de l'antigène. Le Pneumo 23 étant une combinaison vaccinale, les 23 sérotypes sont cultivés, récoltés et purifiés indépendamment, pour être ensuite mélangés lors de l'étape de mise sous forme pharmaceutique.

VIII.2 Culture des cellules

Concernant la culture cellulaire, le diagramme de production est présenté en figure 34. Le point de départ de ce procédé est la reprise du lyophilisat. En effet, la conservation des souches à long terme utilise cette technique, ce qui permet vis-à-vis des congelats une conservation plus longue, et moins dépendante des équipements. La reprise du lyophilisat

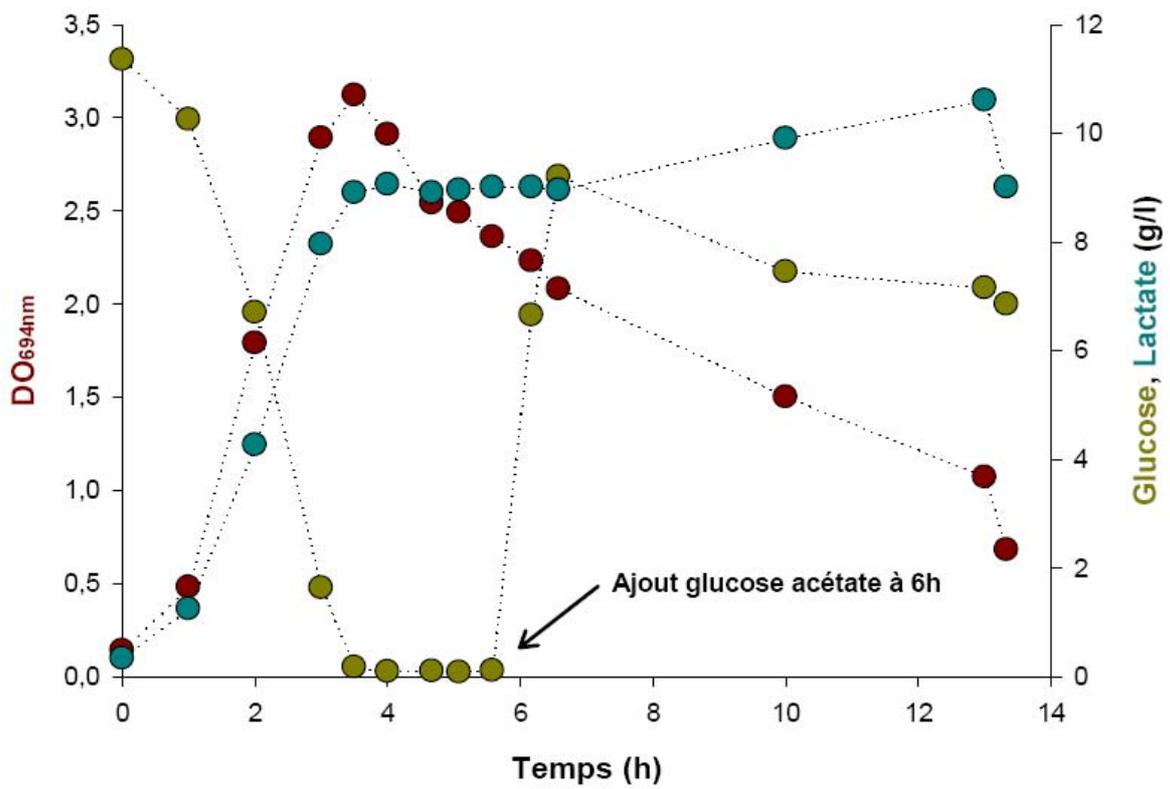


Figure 35. Profil type de fermentation en production de *S. pneumoniae* (sérotype 33F). Données Sanofi-Pasteur.

est effectuée avec du milieu de base pneumo, dont la composition est décrite dans la partie Matériel et Méthodes (paragraphe II.2.1).

Il est nécessaire de rappeler que le milieu de base contient uniquement la tryptone et les acides aminés libres, les vitamines et le sucre étant supplémentés avec une solution d'enrichissement lors des étapes de culture liquide. Le lyophilisat ainsi repris sert à ensemercer la première préculture solide, à savoir 8 flasks (boîtes de culture de forme parallélépipédiques) contenant du milieu de base pneumo gélosé, et supplémenté avec 5% de sang défibriné de cheval.

Après un premier passage sur milieu solide (20 ± 4 h), un deuxième passage est effectué pour augmenter le nombre de cellules en passant à 16 flasks, tout en conservant les mêmes conditions de cultures (16 ± 4 h). Toutes les cultures sur milieu solide sont effectuées sous atmosphère d'air. Rappelons que la gélose au sang est le milieu de culture standard de *S. pneumoniae*, et possède le double avantage d'éviter un effet néfaste de l'oxygène grâce à l'hémoglobine, mais aussi de mieux visualiser les clones.

La première étape de culture liquide consiste en l'ensemencement de 2 spinners (dont un de secours) : cuves en inox de 10 l contenant 7,5 l de milieu de base pneumo, supplémenté en solution d'enrichissement au moment de la culture. A ce stade, la culture n'est pas dégazée en CO₂, la solution d'enrichissement contenant de l'acide thioglycolique (réducteur puissant permettant de fixer l'oxygène). Le spinner permet d'ensemencer le pré-fermenteur, lui-même servant à ensemercer le fermenteur de production. Concernant spinner et pré-fermenteur, le pH_{initial} n'est pas régulé, l'acidification n'étant pas suffisamment importante pour inhiber la croissance.

La culture en fermenteur industriel s'effectue dans un bioréacteur de 2000 l de volume total, dans lequel un dégazage en CO₂ puis une régulation du pH à 7,2 sont effectués. Le pH est régulé à 7,2 pour la majorité des sérotypes, à l'exception des sérotypes 1 et 5 pour lesquels le pH est régulé respectivement à 6,8 et 6,2.

L'ajout d'une solution de glucose-acétate est réalisé à 6 h de culture, permettant de revenir à une concentration proche de la concentration initiale en glucose. La durée de culture en fermenteur industriel est tablée sur 13 ± 3 h, puis une mise sous froid à 15°C est programmée pour l'arrêt de culture.

Comme présenté en figure 34, les différentes étapes du procédé sont cadrées par des contraintes industrielles (temps de culture).

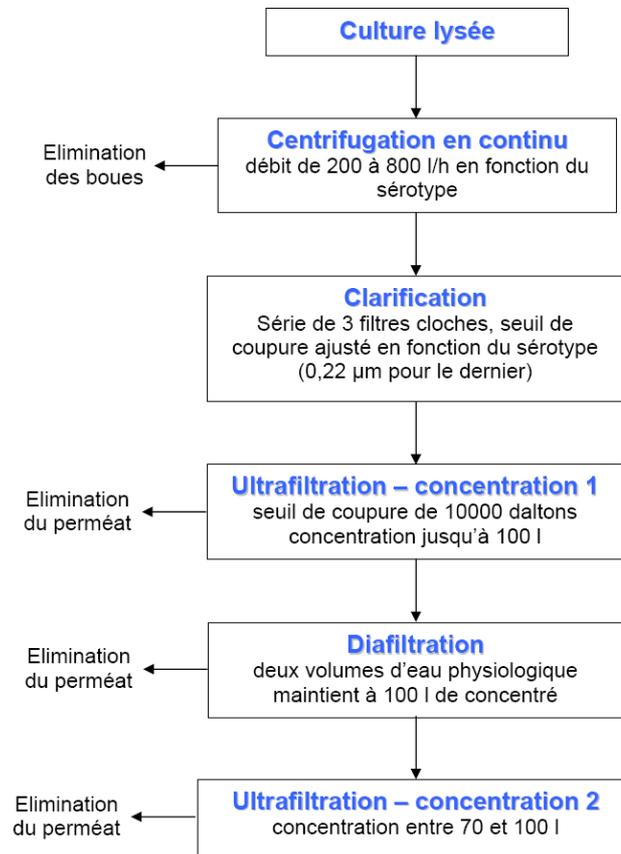


Figure 36. Diagramme de production du procédé Pneumo 23 pour la partie récolte. Données Sanofi-Pasteur.

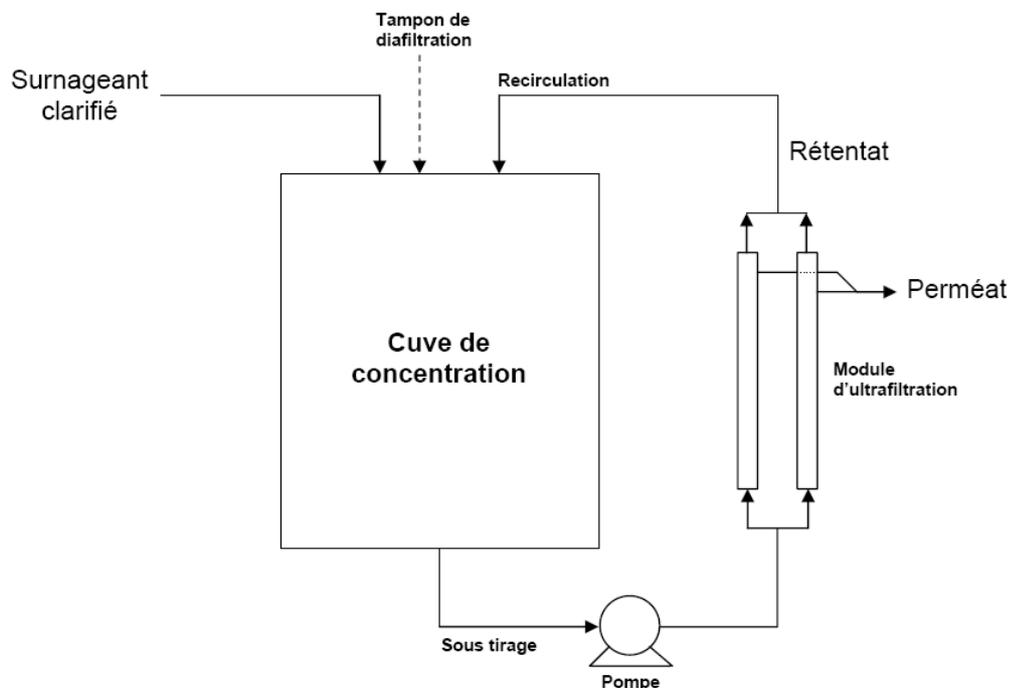


Figure 37. Représentation schématique de l'étape de concentration / diafiltration du vaccin Pneumo 23. Données Sanofi-Pasteur.

La figure 35 présente un profil de fermentation standard en production (ici le sérotype 33F). La phase de culture cellulaire se termine, après refroidissement de la culture, par une lyse des cellules en présence de désoxycholate de sodium.

Comme je l'ai déjà décrit, le désoxycholate est un sel biliaire ayant la propriété d'induire l'autolysine (LytA) du pneumocoque. Cette lyse n'est pas directement effectuée dans le fermenteur, mais après transfert de la culture dans une première cuve de récolte.

Rappelons enfin que le milieu de culture utilisé par Sanofi-Pasteur est très proche du milieu Hoeprich (Hoeprich, 1955), aussi bien dans sa composition que dans ses préconisations de fabrication.

VIII.3 Récolte

La phase de récolte consiste en la séparation de l'antigène d'intérêt (le polysaccharide capsulaire) vis-à-vis des principaux constituants cellulaires. Cette phase est décrite dans le diagramme de récolte en figure 36.

La première étape consiste en une séparation grossière des principaux débris cellulaires, et ce via une centrifugeuse en continu dont le débit d'alimentation est ajustable en fonction des sérotypes utilisés. Les boues sont éliminées, et le surnageant est directement envoyé dans trois filtres clarifiants placés en série, dont les seuils de coupure sont ajustables.

Quelque soit le sérotype, le dernier filtre possède un seuil de coupure de 0,22 μm . Le surnageant ainsi clarifié est transféré dans une cuve de concentration, reliée à un module d'ultrafiltration (seuil de coupure de 10 kD) via une pompe permettant la recirculation du produit (figure 37).

La concentration s'effectue par élimination progressive du perméat (contenant les impuretés), le rétentat contenant le polysaccharide capsulaire. Le surnageant ainsi concentré est ensuite transféré dans un autre bâtiment pour être purifié.

Il est important de préciser que la récolte est adaptée à chacun des sérotypes cultivés. En effet, je montrerai dans la partie résultats que les sérotypes diffèrent dans leur capacité de croissance et de production du polysaccharide capsulaire, nécessitant certains ajustements au niveau de l'étape de récolte.

VIII.4 Purification

Je n'entrerai pas dans les détails concernant cette dernière partie du procédé, étant donné qu'elle n'a pas été directement concernée par ce travail. En résumé, l'étape de purification consiste en une série de précipitations / centrifugations, permettant d'éliminer spécifiquement certains composés cellulaires. Par exemple, la précipitation par les sels permet d'éliminer les protéines, tandis que la précipitation à l'alcool élimine essentiellement les acides nucléiques. A l'issue de cette purification, le polyside est récupéré sous forme de poudre, qui est alors prise en charge par le service de mise sous forme pharmaceutique pour être conditionné.

Chapitre III: Résultats et Discussion

I. Compréhension du comportement physiologique de *S. pneumoniae* en conditions de culture industrielle.

I.1 Stratégie expérimentale

La résolution de la problématique de ce sujet de thèse a nécessité en premier lieu la compréhension du comportement physiologique de *S. pneumoniae*, et ce dans l'environnement dans lequel il est placé pour la production du vaccin Pneumo 23. Dans cette optique, le comportement différentiel en termes de productivité capsulaire des 23 sérotypes a été un outil de choix. De plus, les mécanismes à l'origine du contrôle de la synthèse capsulaire sont encore mal compris à ce jour, ce qui représente un challenge intéressant sur un plan fondamental. Le point de départ a été de travailler avec un sérotype « modèle » ne présentant pas de problèmes particuliers en production, à savoir un isolat clinique de sérotype 4. Ce sérotype présente l'avantage supplémentaire d'avoir une souche dont le génome a été entièrement séquencé, bien que l'isolat clinique avec lequel j'ai travaillé puisse présenter des différences significatives au niveau génétique. En parallèle, un sérotype « à problème » a été analysé, mon choix s'étant porté sur un isolat clinique de sérotype 5, plus faible producteur de polysaccharide capsulaire en conditions industrielles chez Sanofi-Pasteur. Le choix des sérotypes ainsi fait, une démarche expérimentale classiquement utilisée par mon équipe de recherche pour d'autres bactéries lactiques a été mise en place. Ainsi, l'évaluation du comportement des deux sérotypes à différents niveaux d'analyse a été décidée. Une analyse macrocinétique a tout d'abord été effectuée dans l'environnement maîtrisé de la culture en fermenteur, en choisissant des conditions quasi-identiques à celles utilisées chez Sanofi-Pasteur. Dans ce cadre, j'ai été amené à mettre en place un modèle d'étude à l'échelle 5 l, dont les détails seront exposés dans la partie II.1. Par la suite, la prise d'échantillon sur les différentes cultures m'a permis d'évaluer au niveau moléculaire le comportement des deux sérotypes, avec une analyse du métabolisme central puis du niveau d'expression des gènes. Au-delà, plusieurs travaux de biologie moléculaire couplés à une analyse bioinformatique ont été réalisés, dans une optique de compréhension de différents mécanismes de régulation de *S. pneumoniae*.

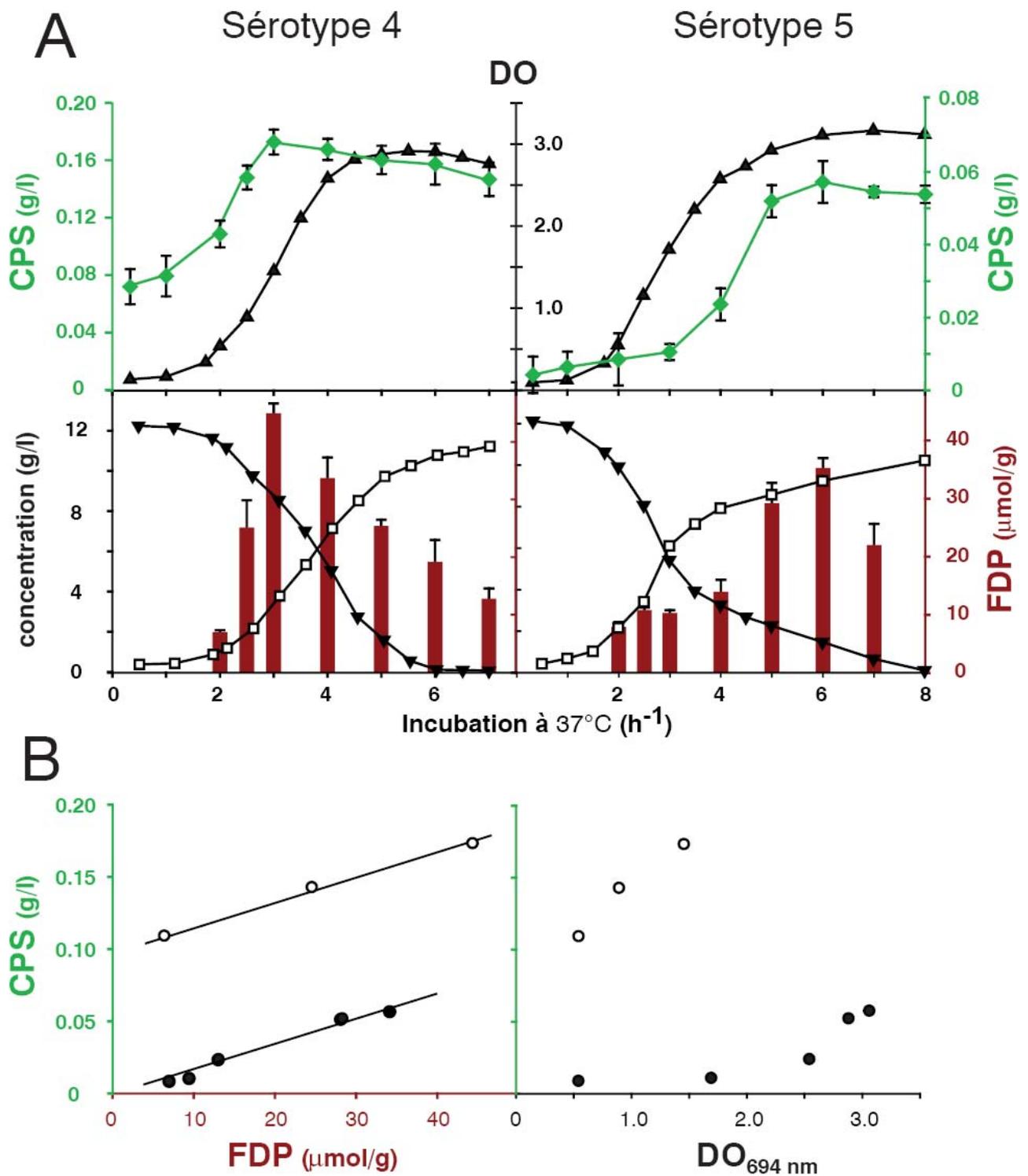


Figure. 38. Variations souches-spécifiques des cinétiques de production capsulaire et du métabolisme carboné. (A) Croissance (DO_{694nm} , triangles noirs) et synthèse capsulaire (CPS, g/l; losanges verts) des sérotypes 4 et 5 en conditions de culture industrielle (panneau du haut). Concentrations intracellulaires en FDP (histogrammes), glucose (triangles noirs), lactate (carrés blancs) (panneau du bas). (B) Corrélation entre le FDP et le titre en capsule pour le sérotype 4 (entre 2 h et 3 h de culture, $R^2 = 0.997$; cercles blancs) et le sérotype 5 (entre 2 h et 6 h de culture, $R^2 = 0.986$; cercles noirs) (panneau de gauche). A titre de comparaison, la corrélation entre FDP et DO n'est pas valable (panneau de droite).

I.2 Principaux résultats et discussion

I.2.1 Analyse macrocinétique : le métabolisme carboné et la productivité capsulaire sont souches-spécifiques

Je ne détaillerai pas dans ce paragraphe l'ensemble des données macrocinétiques obtenues, mais plutôt les principales tendances obtenues. Une analyse plus approfondie du modèle mis en place et du comportement fermentaire des souches sera effectuée dans la partie II des résultats.

- ✓ Les deux souches étudiées présentent une capacité différentielle de production capsulaire

Rappelons que ces cultures ont été réalisées dans des fermenteurs de 5 l, en conditions d'anaérobiose avec un pH régulé à 7,2. Le milieu de culture est celui utilisé par Sanofi-Pasteur pour la production du vaccin Pneumo 23, la source de carbone étant du glucose (12 g/l) et la source azotée de la tryptone (30 g/l) (cf. paragraphe II.1.1, Matériel et Méthodes). Le suivi macrocinétique des deux isolats cliniques des sérotypes 4 et 5 en conditions de culture industrielle est présenté en figure 38A (panneau du haut). Dans le cas du sérotype 4, on constate que la synthèse capsulaire est maximale pendant la phase exponentielle de croissance, avec atteinte d'un titre de 0,17 g/l après 3 h de culture. Cette phase de production est directement suivie d'une chute progressive du titre en capsule, parallèlement au ralentissement de la croissance et à l'atteinte de la phase stationnaire. Pour le sérotype 5, la synthèse capsulaire est décalée dans le temps vis-à-vis du sérotype 4. En effet, celle-ci devient prédominante lors du ralentissement de la croissance, mais avec un niveau de productivité beaucoup plus faible que celui observé pour le sérotype 4. Ainsi, le titre maximal en CPS est seulement de 0,05 g/l, titre atteint après plus de 5 h de culture. Il existe donc, sans aller au niveau moléculaire, un différentiel de comportement de ces deux souches au niveau macrocinétique. Ce différentiel est d'autant plus intéressant qu'il ne se traduit pas par une différence de productivité en biomasse, les profils de croissance étant similaires (figure 38A, panneau du haut).

✓ Variations observées concernant le métabolisme carboné

Dans les conditions étudiées, les sérotypes 4 et 5 convertissent majoritairement le glucose en acide lactique, et ce pendant la phase exponentielle de croissance (figure 38A, panneau du bas). La production d'acide lactique s'accompagne d'une production d'acétate, de formiate et d'éthanol lors du ralentissement de la croissance, par homologie avec ce qui est classiquement observé chez *L. lactis* (les bilans macrocinétiques détaillés sont présentés dans la partie II des résultats). Malgré des cinétiques de croissance équivalentes (taux de croissance proches de 1 h^{-1} dans les deux cas), des différences significatives existent entre les deux souches concernant la consommation du glucose. Dans le cas du sérotype 4, la phase de décélération est caractérisée par une chute du taux de croissance et de l'activité catabolique, parallèlement à l'épuisement du glucose dans le milieu de culture. Le profil du sérotype 5 est différent, puisque l'arrêt de croissance s'établit alors que la concentration résiduelle en glucose est de l'ordre de 3 g/l, conduisant à une phase de post-acidification durant laquelle l'activité catabolique est maintenue en absence de croissance. Il est intéressant de noter que les deux souches présentent un comportement homolactique durant la phase exponentielle de croissance, mais que la post-acidification du sérotype 5 se traduit par une dérive importante vers le métabolisme mixte (cf. paragraphe II.2.1, Résultats). A titre indicatif, les vitesses spécifiques de consommation du glucose en phase exponentielle de croissance sont respectivement de 13,3 mmol/g/h pour le sérotype 4, et de 10,1 mmol/g/h pour le sérotype 5.

I.2.2 Analyse du métabolisme central : accumulation différentielle d'intermédiaires glycolytiques clé

L'étude du métabolisme central de *S. pneumoniae* a constitué la première étape de l'analyse moléculaire des deux sérotypes étudiés. Celle-ci a consisté à doser en cours de fermentation plusieurs intermédiaires glycolytiques, indicateurs très sensibles de l'activité catabolique de la cellule. Cette quantification a été réalisée sur des prélèvements directement congelés en azote liquide, ce qui permet de figer l'activité métabolique (cf. partie IV.1, Matériel et Méthodes).

L'ensemble des résultats obtenus pour ces dosages est présenté en table 18.

✓ Accumulation différentielle du FDP et des trioses phosphates

L'analyse des résultats montre tout d'abord que le G6P, le G1P, le F6P et le PEP ne présentent pas de variations significatives de concentration au cours de la culture en valeurs absolues, et ce quelque soit le sérotype.

La voie de synthèse du polysaccharide capsulaire ayant comme point de départ une déviation du flux glycolytique au niveau du G6P vers la production de G1P, les données indiquent que la différence de synthèse capsulaire observée entre les sérotypes n'est donc pas la conséquence de la disponibilité de ces intermédiaires. Par ailleurs, les résultats montrent que le FDP et les trioses phosphates (DHAP et GAP) présentent des variations significatives en cours de culture, et sont sérotype dépendantes.

Dans le cas du sérotype 4, FDP et trioses phosphates atteignent des valeurs maximales pendant la phase exponentielle de croissance (titre maximal obtenu pour 3 h de culture), pour diminuer progressivement à mesure que l'activité glycolytique chute, parallèlement à l'épuisement du glucose.

Cette observation est en accord avec le modèle établi chez *L. lactis* pour lequel un haut flux glycolytique (ratio NADH / NAD⁺ élevé) se traduit par une augmentation du FDP et des trioses phosphates, qui sont situés en amont de la réaction limitante de la glycolyse (GAP → 1,3PG, réaction consommatrice de NAD⁺). Dans le cas du sérotype 5, les concentrations en FDP et trioses phosphates restent relativement constantes durant la phase exponentielle de croissance, et à des niveaux plus faibles que ceux observés pour le sérotype 4. Cependant, on observe une augmentation significative de ces pools pendant la période de décélération de la croissance (associée à la phase de post-acidification), atteignant des titres maxima à 6 h de culture.

Leur concentration chute ensuite, une fois que le glucose résiduel est quasiment nul. Les profils d'accumulation du FDP pour chaque sérotype sont présentés en figure 38A (panneau du bas).

Quelque soit le sérotype, les fluctuations observées pour le FDP et les trioses phosphates sont la conséquence du niveau de flux dans la glycolyse, et du degré de saturation de la voie.

Table 18. Concentrations intracellulaires en intermédiaires glycolytiques ($\mu\text{mol/g}$) durant la croissance des sérotypes 4 et 5 de *S. pneumoniae*.

Métabolites	Sérototype 4										
	Phase Exponentielle					Concentrations ($\mu\text{mol/g}$)					
	2 h	2.5 h	3 h	4 h	5 h	Phase stationnaire					
G6P	8.6 \pm 0.8	10.2 \pm 0.2	11.9 \pm 1.6	10.8 \pm 0.6	11.1 \pm 0.4	9.6 \pm 1.2	7.7 \pm 1.5				
G1P	0.13 \pm 0.04	0.35 \pm 0.2	0.70 \pm 0.3	0.97 \pm 0.2	1.3 \pm 0.3	0.84 \pm 0.6	0.21 \pm 0.07				
F6P	0.5 \pm 0.1	0.9 \pm 0.2	1.24 \pm 0.3	1.54 \pm 0.1	1.8 \pm 0.4	1.3 \pm 0.4	1.34 \pm 0.02				
FDP	6.4 \pm 0.7	24.6 \pm 5.0	44.4 \pm 2.0	33.2 \pm 3.9	24.8 \pm 1.4	18.6 \pm 4.1	12.2 \pm 4.4				
DHAP / GAP	4.8 \pm 1.5	8.3 \pm 0.3	21.2 \pm 1.9	16.2 \pm 3.1	14.7 \pm 1.8	13.2 \pm 3.2	7.4 \pm 4.1				
PEP	0.47 \pm 0.25	0.9 \pm 0.1	0.86 \pm 0.1	1.23 \pm 0.2	2.5 \pm 0.5	1.2 \pm 0.5	1.29 \pm 0.06				

Métabolites	Sérototype 5										
	Phase Exponentielle					Concentrations ($\mu\text{mol/g}$)					
	2 h	2.5 h	3 h	4 h	5 h	Phase stationnaire					
G6P	5.5 \pm 2.0	6.24 \pm 2	6.6 \pm 1.9	7.3 \pm 1.1	13.1 \pm 3.2	12.5 \pm 2.6	8.4 \pm 1.3				
G1P	1.0 \pm 0.5	<X ^a	<X	0.9 \pm 0.2	<X	<X	<X				
F6P	0.7 \pm 0.2	1.6 \pm 0.6	1.7 \pm 0.1	1.9 \pm 0.2	1.1 \pm 0.5	1.4 \pm 0.3	0.7 \pm 0.1				
FDP	7.0 \pm 1.2	10.0 \pm 0.8	9.5 \pm 0.8	13.1 \pm 2.4	28.3 \pm 3.9	34.4 \pm 2	21.2 \pm 4.0				
DHAP / GAP	8.4 \pm 1.7	8.2 \pm 1.3	5.1 \pm 1.4	6.2 \pm 2.3	18.7 \pm 4.8	23.2 \pm 2.2	13.2 \pm 1.4				
PEP	1.2 \pm 0.2	0.5 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	2.3 \pm 0.4	2.9 \pm 0.7	3.2 \pm 0.3	1.1 \pm 0.2				

^a : non détecté (i.e., en dessous du seuil de détection).

L'accumulation observée en phase stationnaire pour le sérotype 5 nécessite d'aller un peu plus loin, en considérant la notion de flux relatif à la demande énergétique pour la croissance. En effet, le maintien d'un flux carboné (même faible) durant la phase de post-acidification, conjugué à une demande énergétique quasi nulle en absence de croissance, donne un flux relatif fort à l'origine de l'accumulation de ces intermédiaires.

- ✓ Corrélation entre l'accumulation du FDP et la synthèse capsulaire : hypothèse d'une connexion entre métabolisme central et synthèse capsulaire

De façon intéressante, la concentration maximale en FDP coïncide avec le titre maximal en capsule obtenu pour chacun des deux sérotypes étudiés. Ce parallèle nous a conduit à établir une corrélation entre le titre en polysaccharide capsulaire et l'accumulation du FDP pour les sérotypes 4 et 5, présentée en figure 38B (panneau de gauche). Dans les deux cas, les coefficients de corrélation linéaire sont proches de 0,99, suggérant un lien potentiel entre activité du métabolisme central et synthèse capsulaire. Comme présenté en figure 38B (panneau de droite), cette corrélation n'existe plus entre titre en capsule et densité optique. J'ajouterai qu'une corrélation entre accumulation du G6P et titre en capsule est elle aussi tangible, bien que les variations du titre en G6P soient beaucoup moins significatives que celles observées pour le FDP ou les trioses phosphates.

Ainsi, l'ensemble des résultats indique d'une part que la synthèse capsulaire ne semble pas liée à la disponibilité en précurseurs fournis par le métabolisme carboné (G1P), et suggère d'autre part que les variations observées sont potentiellement dépendantes de mécanismes dans lesquels le FDP pourrait jouer un rôle central. Etant donné que le niveau de régulation de la synthèse capsulaire n'est visiblement pas métabolique, l'hypothèse d'un contrôle transcriptionnel a été formulée à ce stade de l'analyse. Comme présenté dans le paragraphe III.1.4 de la bibliographie, le FDP (tout comme le G6P) est un effecteur allostérique du régulateur transcriptionnel CcpA, mais stimule aussi l'activité kinase de l'HprK/P et donc la production de la P-Ser-HPr, co-activateur principal de la CcpA.

Les corrélations obtenues suggèrent ainsi un effet possible du pool de FDP sur l'activité transcriptionnelle CcpA-dépendante au niveau du locus capsulaire. De plus, cette hypothèse est en accord avec les résultats de Giammarinaro et Paton (2002) qui ont observé une chute de l'expression de fusions *lacZ::cps* après inactivation de *ccpA*, sur glucose et saccharose.

Table 19. Analyse des niveaux d'expression de gènes d'intérêt des sérotypes 4 et 5 de *S. pneumoniae* par RT-PCR quantitative. Phase exponentielle de croissance, 2 h et 3 h, et phase stationnaire, 6 h.

Opéron gène	Fonction(s)	Type 4 Phase expo. (ratio 3 h/2 h)	Type 4 Phase stat. (ratio 6 h/2 h)	Type 4/Type 5 Phase expo. (3 h)	Type 5/Type 4 Phase stat. (6 h)
<i>cps</i>	Synthèse capsulaire				
<i>cpsA</i>	Activateur transcriptionnel	15.3 ± 0.7	0.1 ± 0.02	12.1 ± 1.1	3.3 ± 0.4
<i>cpsB</i>	P-tyrosine phosphatase	17.2 ± 1.7	0.13 ± 0.04	27.0 ± 3.6	3.0 ± 0.2
<i>cpsC</i>	Attachement du CPS à la paroi	21.6 ± 1.1	0.12 ± 0.03	36.1 ± 2.2	4.0 ± 0.2
<i>cpsD</i>	Polymérisation et export (avec CpsC); Tyrosine kinase	22.6 ± 1.7	0.09 ± 0.008	23.6 ± 2.1	3.1 ± 0.5
<i>cpsE</i>	Transférase	24.4 ± 0.7	0.09 ± 0.017	44.4 ± 3.2	4.5 ± 0.8
<i>cpsF</i>	Glycosyl transférase	16.4 ± 2.1	0.06 ± 0.008	36.4 ± 2.6	5.0 ± 1.1
<i>lic1</i>	Assimilation et utilisation de la choline				
<i>spr1148</i>	CDP-ribitol pyrophosphorylase	246.3 ± 17.2	1.7 ± 0.2	158.7 ± 8.3	45.5 ± 2.7
<i>spr1149</i>	Alcool déshydrogénase	49.4 ± 2.1	31.2 ± 2.6	58.4 ± 5.4	32.2 ± 4.3
<i>licA</i>	Choline kinase	160.2 ± 13.4	1.2 ± 0.2	99.7 ± 7.3	40.0 ± 4.4
<i>licB</i>	Transporteur de choline	33.5 ± 3.2	27.9 ± 2.5	51.3 ± 6.1	18.9 ± 1.4
<i>licC</i>	P-Choline cytidyltransférase	36.6 ± 4.4	24.4 ± 3.8	63.7 ± 6.7	17.2 ± 2.6
<i>lic2</i>	Incorporation de la choline dans les TA				
<i>tacF</i>	Flippase (24)	2.3 ± 0.4	1.5 ± 0.4	0.4 ± 0.08	2.4 ± 0.2
<i>licD1</i>	Décoration des TA avec P-Cho	2.6 ± 0.2	1.4 ± 0.09	0.3 ± 0.03	1.9 ± 0.4
<i>licD2</i>	Décoration des TA avec P-Cho	2.4 ± 0.09	0.8 ± 0.01	0.3 ± 0.06	2.1 ± 0.5
<i>ilvBNC-A</i>	Synthèse des acides aminés branchés				
<i>ilvB</i>	Acétolactate synthase	2.4 ± 0.9	0.6 ± 0.2	4.4 ± 1.1	2.3 ± 0.4
<i>livJHMGF</i>	Transport des acides aminés branchés				
<i>livJ</i>	Substrat-binding protein	1.9 ± 0.09	0.8 ± 0.01	2.4 ± 0.3	1.8 ± 0.3
<i>pts-bgaA</i>	Sucres alternatifs				
<i>spr0562</i>	Système PTS IIA	0.4 ± 0.09	1.8 ± 0.1	0.5 ± 0.04	0.6 ± 0.04
<i>bgaA</i>	β-galactosidase (rôle d'adhésion)	0.3 ± 0.03	2.1 ± 0.3	0.6 ± 0.08	0.5 ± 0.09
	Glycolyse				
<i>ackA</i>	Acétate kinase	1.9 ± 0.3	0.8 ± 0.08	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.09
<i>eno</i>	Enolase	4.8 ± 1.3	0.6 ± 0.2	4.1 ± 1.4	3.4 ± 1.3
<i>fba</i>	Fructose-bisphosphate aldolase	2.3 ± 0.4	0.7 ± 0.09	2.9 ± 0.7	2.3 ± 0.1
<i>ldh</i>	Lactate déshydrogénase	3.4 ± 0.9	0.7 ± 0.04	3.7 ± 1.4	4.2 ± 1.2
<i>pfkA</i>	Phosphofructokinase	2.3 ± 0.6	0.4 ± 0.02	3.4 ± 1.1	3.1 ± 0.09
<i>pykF</i>	Pyruvate kinase	2.1 ± 0.2	0.4 ± 0.03	3.1 ± 0.6	2.8 ± 1.1
<i>tpi</i>	Triose phosphate isomerase	1.9 ± 0.2	0.6 ± 0.04	3.1 ± 0.2	2.9 ± 0.7
	Régulateurs				
<i>ccpA</i>	Régulateur transcriptionnel global	5.0 ± 1.1	2.6 ± 0.7	2.8 ± 0.7	2.7 ± 0.3
<i>codY</i>	Régulateur transcriptionnel global	0.65 ± 0.06	1.9 ± 0.6	0.61 ± 0.03	0.71 ± 0.01
	Autres				
<i>gyrA</i>	DNA gyrase	2.9 ± 0.5	0.6 ± 0.05	3.2 ± 0.9	3.4 ± 0.3

L'analyse de l'expression des gènes présentée ci-après a constitué la deuxième étape de l'analyse moléculaire des deux sérotypes. Nous allons voir que celle-ci a permis d'argumenter en faveur de l'hypothèse qui vient d'être formulée, concernant la connexion entre métabolisme central et synthèse capsulaire.

I.2.3 Analyse de l'expression des gènes : corrélation entre activité métabolique et transcription de gènes d'intérêt

✓ Démarche expérimentale

La première approche envisagée pour analyser le niveau d'expression des gènes de *S. pneumoniae* a été l'utilisation de puces à ADN. Celles-ci permettent la réalisation d'une analyse globale à l'échelle du génome, assurant un criblage des gènes d'intérêt dont l'expression a été par la suite vérifiée avec la RT-PCR quantitative (cf. partie V, Matériel et Méthodes). Pour caractériser de façon dynamique le comportement des deux sérotypes, le transcriptome a été analysé à 3 points clés de la culture : à 2 h soit le début de la phase exponentielle de croissance, à 3 h pendant la phase exponentielle de croissance, puis à 6 h lors de l'atteinte de la phase stationnaire. 4 répétitions indépendantes ont été effectuées pour chaque culture. Concernant ces différents stades de culture, la quantité d'ARN total extraite est restée quasi-constante autour de $15\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ de masse sèche, pour chacun des deux sérotypes (via le calcul des rendements d'extraction). Dans un souci de simplification, je présenterai uniquement les données concernant les gènes qui nous intéressent plus particulièrement, et ayant fait l'objet d'une confirmation de leurs niveaux d'expression via la RT-PCR quantitative. Les données les plus pertinentes obtenues à l'aide des puces à ADN sont présentées en Annexe 1 (comparaisons des deux sérotypes à 3 h puis à 6 h de culture), l'ensemble des données brutes ayant fait l'objet d'un dépôt sur la plateforme GEO / NCBI (GSE9670). Les données obtenues en RT-PCR quantitative sont présentées en table 19.

✓ Corrélation entre activité du métabolisme central et transcription de plusieurs gènes d'intérêt

Concernant l'activité transcriptionnelle des gènes codant pour la synthèse capsulaire (opéron *cps*), seuls les 6 premiers gènes de l'opéron ont été considérés dans l'analyse, leur

niveau d'homologie étant supérieur à 90 % entre le sérotype 4 et le sérotype 5. Les résultats indiquent que l'ensemble de ces gènes présente une induction significative en phase exponentielle de croissance (3 h), vis-à-vis de la phase stationnaire dans le cas du sérotype 4 (6 h). Ainsi, le niveau d'expression de ces gènes est directement corrélé à la synthèse capsulaire et à l'activité du métabolisme central de ce sérotype. De plus, la chute significative de leur niveau d'expression lors de l'atteinte de la phase stationnaire suggère que la synthèse capsulaire est fortement réprimée lorsque la limitation en source carbonée est atteinte. La comparaison inter-sérotype en phase exponentielle de croissance confirme pour sa part une forte induction de ces gènes en faveur du sérotype 4, en accord avec le fort différentiel de productivité en capsule observé à ce stade de la culture vis-à-vis du sérotype 5. Cette tendance s'inverse lors de l'atteinte de la phase stationnaire pour laquelle on observe une induction des gènes capsulaires du sérotype 5, vis-à-vis du sérotype 4. Ainsi, les profils d'expression de ces gènes sont en totale adéquation avec l'hypothèse formulée précédemment concernant une régulation CcpA-FDP dépendante de la synthèse capsulaire (directe ou indirecte).

Il est intéressant de noter qu'un nombre important de gènes présentent des profils d'expression similaires à celui obtenu pour les gènes capsulaires, à commencer par l'opéron *lic1*. Pour rappel, cet opéron contient les gènes codant pour l'assimilation et la modification de la choline, exigence indispensable au pneumocoque aussi bien sur le plan nutritionnel que celui de la virulence (cf. paragraphe III.2 de la bibliographie). Plusieurs gènes de *lic1* possèdent les seuils d'induction les plus élevés, aussi bien en RT-PCR quantitative qu'en puces à ADN, avec des niveaux maxima obtenus en phase exponentielle de croissance. La chute de l'expression lors de l'atteinte de la phase stationnaire est moins évidente que celle observée pour l'opéron *cps*, puisque deux gènes seulement (*spr1148* et *licA*) voient leur niveau d'expression fortement chuter. Ces observations indiquent d'une part l'existence de mécanismes de régulation au sein même du transcrit *lic1* à l'origine des variabilités d'expression observées entre les gènes, et d'autre part une régulation permettant le maintien de l'activité transcriptionnelle en phase stationnaire (contribution probable du régulateur CiaR, cf. paragraphe III.2.3 de la bibliographie).

Les niveaux d'expression de *lic1* m'ont amené à analyser le comportement des gènes de l'opéron *lic2*, impliqué pour sa part dans l'incorporation de la choline dans les acides teichoïques. Bien que les niveaux soient beaucoup plus faibles que ceux obtenus pour *lic1*, on observe là encore une induction de *lic2* en phase exponentielle vis-à-vis de la phase stationnaire pour le sérotype 4. Toutefois, la comparaison des phases exponentielles fait

exception, puisque *lic2* est clairement plus exprimé dans le cas du sérotype 5. Etant donné que *lic2* a été démontré comme étant induit par l'absence de choline (Desai *et al.*, 2003), cette induction spécifique pourrait refléter un état de carence de la part du sérotype 5.

Concernant le métabolisme carboné, la plupart des gènes glycolytiques sont induits parallèlement aux gènes capsulaires, suggérant là encore un lien avec le métabolisme central. Ces gènes ayant été en majorité identifiés comme régulés positivement par CcpA chez d'autres espèces, nos résultats semblent confirmer cette tendance pour *S. pneumoniae*. Vis-à-vis de *L. lactis* pour lequel *pykF*, *pfkA* et *ldh* sont organisés en opéron (opéron *las* régulé positivement par CcpA), *S. pneumoniae* possède une organisation légèrement différente puisque *ldh* est indépendant. Toutefois, ce gène donne une réponse similaire suggérant le même type de régulation. Le gène *ackA* répond lui aussi de la même manière, en accord avec une régulation positive par CcpA / CodY déjà identifiée chez *B. subtilis* (cf. paragraphe II.4.2 de la bibliographie). Enfin, l'opéron *pts-bgaA* (beta-galactosidase) est réprimé en réponse à l'activité du métabolisme central, des travaux récents ayant démontré sa répression directe par CcpA (Kaufman et Yother, 2007). Je tiens à préciser que *bgaA* fait donc partie d'un opéron *pts* dont le substrat n'est pas connu. Concernant le métabolisme azoté, des variations significatives ont été détectées pour les opérons *ilvBNCA* et *livJHMGF* (voir aussi l'Annexe 1), tous deux impliqués dans la synthèse et le transport des acides aminés branchés. L'opéron *ilv* a déjà été identifié comme étant régulé positivement par CcpA (Tojo *et al.*, 2005). De plus, *codY*, codant pour le répresseur transcriptionnel global du métabolisme azoté, semble réprimé de la même manière que *bgaA*, ce qui suggère là encore une dépendance vis-à-vis de CcpA. Le gène *ccpA* lui-même présente un profil d'induction en phase exponentielle de croissance (suggérant un mécanisme potentiel d'autorégulation bien que rien de tel n'ait été démontré à ce jour), ainsi que *gyrA* codant pour la sous unité A de l'ADN gyrase (topoisomérase), enzyme impliquée dans la modification de la topologie de l'ADN (Drlica et Zhao, 1997).

Je terminerai en mentionnant un certain nombre de gènes n'ayant pas fait l'objet d'une confirmation de leurs niveaux d'expression en RT-PCR, mais dont le positionnement vis-à-vis des gènes précédents ou dont la fonction présente un intérêt (Annexe 1). Ainsi, différents gènes liés à l'activité métabolique donnent des variations significatives, les métabolismes du glycogène et du galactose étant réprimés en phase exponentielle de croissance pour le sérotype 4. L'opéron *ptsHI* codant pour les composants HPr et EI du PTS semble pour sa part induit durant la croissance exponentielle du sérotype 4, en accord avec une down-régulation de ces deux protéines (gel 2D) dans des mutants *ccpA* de *S. pneumoniae* (Iyer *et al.*, 2005).

Table 20. Localisation et séquence des *cre* et *cyb* identifiées au niveau des gènes potentiellement régulés par CcpA. Les zones encadrées correspondent à des gènes divergents partageant probablement un même promoteur.

Opéron	gène	Séquences <i>cre</i> ou <i>cyb</i> ^a	Activateur ou répresseur ^b	Distance de la -10	Séquence -10	Distance -10 / ATG
<i>ackA</i>		<u>TGAAAACGCTTAA<u>A</u></u>	R	D+3 ^c	(ext) TATAAT	32
		<u>AATTTTCAGATAAT<u>T</u></u>	A	24	(ext) TATAAT	32
<i>ccpA</i>		<u>TGAAAGT<u>G</u>TTTACA</u> ^d (<i>cre1</i>)	R	8	TAGAAT	121
		<u>AGAAATCGATT<u>TGA</u></u> (RUPA)	A	172	TAGAAT	121
<i>codY</i>		<u>TGATAGCGATTAA<u>A</u></u>	R	D-1 ^e	(ext) TATAAT	26
		<u>AATTTTCAGATAAT<u>T</u></u>	R	24	(ext) TATAAT	26
<i>cpsA-F</i>		<u>AGAAATCGATT<u>TGA</u></u> (RUPA)	A	125	TATAAT	30
<i>eno</i>		<u>AGAAAGCGATT<u>ACT</u></u>	A	65	TATTAT	38
<i>fba</i>		<u>AGAAAG<u>G</u>TTTACA</u> ^d	A	66	TAAAAT	50
<i>galKT</i> ← → <i>galR</i>						
	<i>galR</i>	<u>TGTAATCGTTT<u>TCT</u></u>	A	84	TATACT	20
	<i>galKT</i>	<u>AGAAAACGATT<u>TACA</u></u>	R	3 ^c	TACAAT	56
<i>glgBCDA</i>		<u>AGAAAACGCTT<u>TACA</u></u>	R	8 ^x	TATAAT	37
		<u>TGAAATCGGTAT<u>TCT</u></u>	A	95	TATGAT	38
<i>ilvBNC-A</i>		<u>AAAA<u>TT</u>CGAAAA<u>TT</u></u> (<i>cyb1</i>)	R	34	TATGAT	38
		<u>AATTTT<u>G</u>AAAA<u>ATG</u></u> (<i>cyb2</i>)	R	1	TATGAT	38
<i>ldh</i> ← → <i>gyrA-srtA</i>						
	<i>ldh</i>	<u>CTAAAACGTTT<u>TACA</u></u>	A	45	TAGAAT	51
	<i>gyrA</i>	<u>TGTAAACGTTT<u>TAG</u></u>	A	34	(ext) TATAAT	37
<i>lic1</i>		<u>AGAAAT<u>G</u>GACTAG<u>T</u></u> ^d (<i>cre2</i>)	A	83	TATAAT	41
		<u>AGAA<u>TT</u>C<u>T</u>AGT<u>CA</u></u> ^d (<i>cre1</i>)	A	102	TATAAT	41
<i>livJHMGF</i>		<u>GGAAAACGCTAT<u>TACA</u></u>	A	45	TATATT	37
		<u>AATTTTCAGATAAT<u>T</u></u>	R	3	TATATT	37
<i>pfkA-pykF</i>		<u>TGAAATCGTTAT<u>TGA</u></u>	A	55	(ext) TATAAT	38
<i>ptsEII-bgaA</i>		<u>TGACAAC<u>G</u>GTTT<u>CA</u></u> ^f	R	8 ^g	TATACT	35
<i>ptsHI</i>		<u>TGTAAG<u>G</u>GTTAT<u>CA</u></u> ^d	R	7	TATAAT	63
	<i>spr0583</i>	<u>TGAAATCGATAT<u>CA</u></u>	R	U-5 ^j	TATACT	17
<i>tpi-lytC</i>		<u>TGACACAGGTAT<u>TCT</u></u>	A	84	(ext) TATAAT	46

^a : les résidus qui diffèrent des consensus *cre* (TGWNANCGNTNWCA) ou *cyb* (AATTTTCWGAAAAAT) sont soulignés.

^b : A, activateur, R, répresseur. **A** ou **R** indiquent que la prédiction est confirmée par les niveaux d'expression obtenus, **A** ou **R** indiquant que la prédiction ne l'est plus.

^c : le *cre* commence 3 nucléotides en aval de la séquence -10.

^d : le *cre* présente un mésappariement au niveau du CG central (violet).

^e : le *cre* chevauche le dernier nucléotide de la séquence -10.

^f : le changement du G encadré par un C annule l'effet de répression par CcpA (Kaufman et Yother, 2007).

^g : le *cre* chevauche les 5 derniers nucléotides de la séquence -35 (TTGACA).

^j : le *cre* chevauche les 5 premiers nucléotides de la séquence -10.

^x : le *cre* commence 8 nucléotides en aval de la séquence -10.

Concernant la virulence, plusieurs gènes semblent répondre dans le même sens, comme *srtA* (codant pour la sortase) et plusieurs gènes de choline binding protein, à savoir *lytC*, *cbpE* et *cbpG* (cf. paragraphe III.3, Bibliographie).

L'ensemble des résultats obtenus concernant le niveau d'expression de ces gènes est donc en cohérence avec le fait que le sérotype 4 accumule plus de FDP intracellulaire en phase exponentielle de croissance vis-à-vis du sérotype 5. Ce lien potentiel entre le pool de FDP et l'expression de ces gènes est renforcé par l'inversion de tendance en faveur du sérotype 5 lors de l'atteinte de la phase stationnaire. L'hypothèse d'une régulation CcpA-FDP-dépendante pour la plupart de ces gènes est donc attractive, mais nécessite des investigations supplémentaires. Classiquement, une recherche de motifs *cre* (catabolite responsive elements) est le pré requis à la mise en évidence d'une telle régulation. En effet, CcpA complexé à la protéine HPr (phosphorylée sur Ser₄₆) est capable de lier l'ADN au niveau des *cre*, leur position vis-à-vis du promoteur déterminant la nature de la régulation. J'ai donc recherché la présence de ces séquences devant la plupart des gènes que je viens d'analyser précédemment.

I.2.4 Analyse bioinformatique en lien avec l'hypothèse d'une régulation CcpA-FDP dépendante

La recherche de motifs *cre*, devant les gènes pour lesquels une régulation CcpA-FDP dépendante est suggérée, a été réalisée dans le génome de la souche R6 en se basant sur le consensus établi par Weickert et Chambliss pour *B. subtilis* : TGWNANCGNTNWCA (W=A ou T, N=A, T, G ou C). La table 20 présente le résultat de cette analyse, en mentionnant, lorsqu'elles sont présentes, les séquences de reconnaissance du régulateur CodY (*cyb*). Le positionnement du site *cre* potentiel vis-à-vis de la région promotrice est le facteur déterminant de la nature de la régulation. Rappelons que si cette séquence *cre* est positionnée en aval (ou chevauchant) de la séquence - 35, CcpA provoque un mécanisme de répression. Dans le cas inverse, CcpA provoque une induction du gène cible (Zomer *et al.*, 2007). Dans ce cadre, la table 20 précise si la prédiction d'activation ou de répression du gène cible par CcpA (en fonction de la position du *cre* identifié) est confirmée par les données de puces à ADN et RT-PCR quantitative. Enfin, la figure 39 présente l'organisation génétique de plusieurs gènes pour lesquels des *cre* potentiels ont été identifiés.

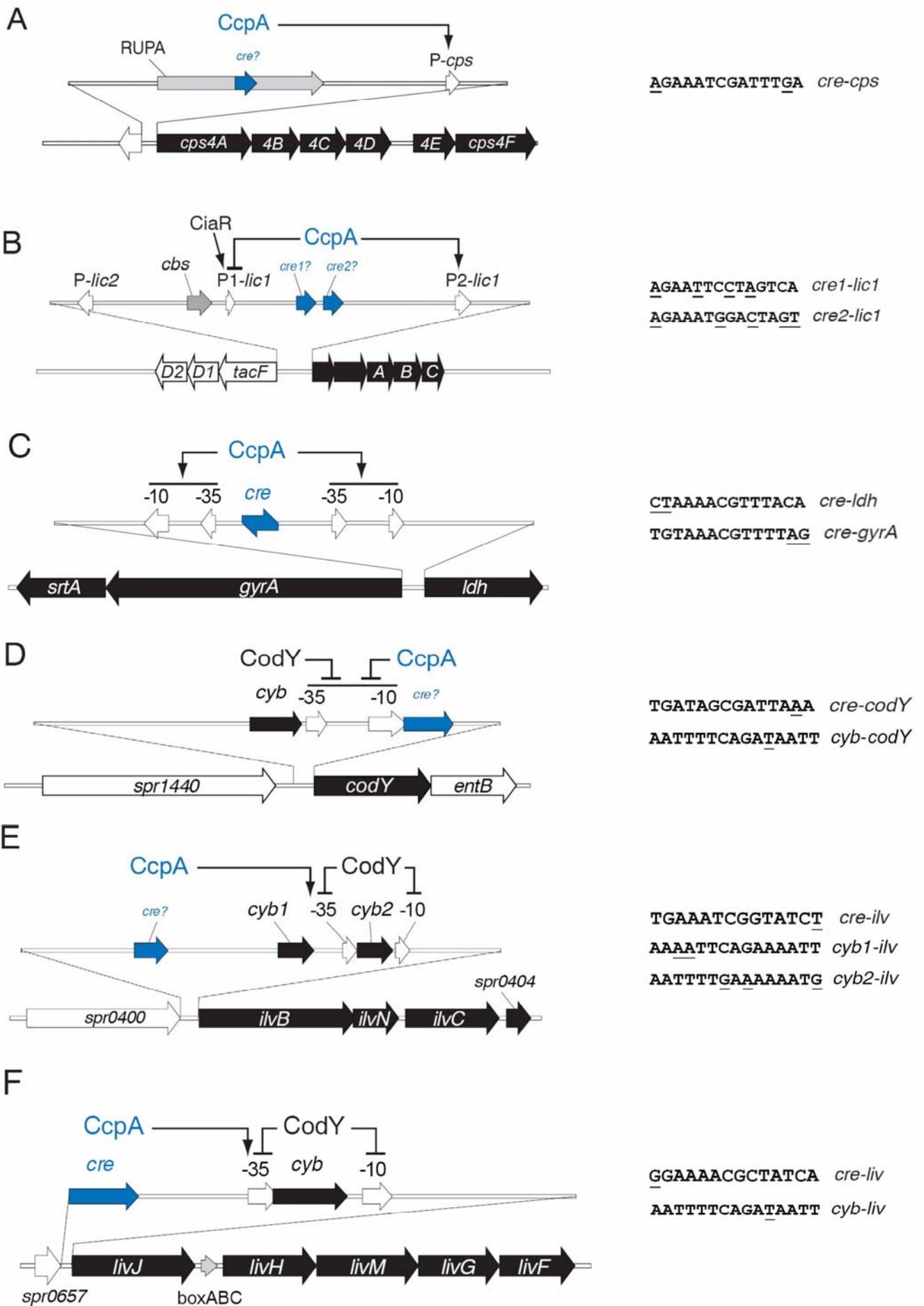


Figure 39. Organisation génétique des locus potentiellement régulés par CcpA. Les sites *cre* et *cyb* sont représentés respectivement par des flèches bleues et noires. A, opéron *cps*, B, locus *lic* (*cbs*, CiaR binding site), C, locus *ldh / gyrA*, D, locus *codY*, E, opéron *ilv*, F, opéron *liv*. Les régulations positives sont représentées par des flèches classiques, les flèches se terminant par un trait perpendiculaire correspondant à une régulation négative.

✓ Opéron *cps* et *ccpA* : sites *cre* potentiels situés dans des éléments répétés

L'analyse bioinformatique révèle la présence d'un site *cre* potentiel situé 125 pb en amont de la séquence -10, qui présente 12 nucléotides homologues au consensus (table 20). Sa position est en accord avec la prédiction d'une régulation positive via CcpA, et renforce ainsi notre hypothèse. Ce site *cre* a la particularité d'être positionné au sein d'un RUPA (Repeat Unit of Pneumococcus, sous type A, figure 39A), élément répété et maintenu de façon stable chez *S. pneumoniae* (Oggioni et Claverys, 1999). Les RUPs sont des séquences de 107 pb, uniquement présentes au niveau des régions intergéniques et dont on différencie 4 sous types en fonction de leur séquence (seul le sous type A possède le *cre* potentiel). Au total, 108 RUPs ont été identifiés dans le génome de la souche TIGR4, sans qu'on leur ait pour autant attribué une fonction claire. Toutefois, leur positionnement dans les régions intergéniques et la présence de structures secondaires dans leur séquence suggère un rôle de terminateur transcriptionnel, ou encore de site de fixation à des protéines régulatrices (Hoskins *et al.*, 2001). L'analyse des régions amont des opérons capsulaires a révélé que les 90 sérotypes possèdent tous un RUPA, avec un *cre* potentiel très conservé. Toutefois, la situation de ce RUP est variable, 63 sérotypes présentant un RUPA situé 120 pb en amont de l'opéron *cps* (comme la souche R6), les 27 autres l'ayant positionné de façon variable du fait de la présence de séquences d'insertion dans cette région (Annexe 5). De la même manière que le locus capsulaire, un site *cre* identifié en amont du gène *ccpA* est lui aussi positionné dans un RUPA. Giammarinaro et Paton (2002) avaient préalablement identifié un *cre* potentiel en amont de *ccpA* (nommé *creI* et présenté en table 20), mais celui-ci ne possède pas de CG central (impliqué dans l'interaction), laissant un doute quant à sa reconnaissance par CcpA. De plus, le positionnement de ce *cre* avait été déterminé vis-à-vis d'une séquence -10 qui est incorrecte, et l'hypothèse d'une activation par ce *cre* est donc probablement fautive (noté comme répresseur en table 20).

✓ Opéron *licI*

Dans le cas de l'opéron *licI* (présenté en figure 39B), deux séquences -10 ont été identifiées, avec une première directement placée en amont du premier gène (promoteur P2, *spr1148*), et une deuxième positionnée 210 pb en amont (promoteur P1). Comme déjà abordé dans la bibliographie (paragraphe III.2.3), le promoteur P1 a récemment été identifié comme

régulé positivement en phase stationnaire par le régulateur CiaR. Cependant, la viabilité des mutants *ciaR* suggère l'intervention du promoteur P2 dans le contrôle de *lic1*, et donc de l'assimilation de la choline (Halfmann, 2007). C'est en amont du promoteur P2 que deux *cre* potentiels ont été identifiés par mon analyse bioinformatique (*cre1-lic1* et *cre2-lic*, table 20), séparés par 19 nucléotides. Pour ces deux *cre* potentiels, le CG central est manquant, bien qu'une étude récente ait montré qu'un CC central permette une fixation par la protéine CcpA purifiée (Kaufman et Yother, 2007), suggérant le fonctionnement d'au moins *cre1-lic1*. De plus, il est possible que CcpA puisse reconnaître *cre2-lic1*, et que l'organisation adjacente de ces deux *cre* potentiels puisse stabiliser l'interaction avec CcpA. L'hypothèse d'un contrôle positif de *lic1* via CcpA est donc légitime à ce stade de l'analyse.

✓ Métabolisme carboné et gènes associés

Trois gènes pour lesquels l'hypothèse d'une régulation positive par CcpA a été formulée, à savoir *ldh*, *gyrA*, et *srtA* présentent une organisation divergente décrite en figure 39C. Un *cre* potentiel, possédant 12 pb homologues au consensus, est présent 45 pb en amont de la séquence -10 du gène *ldh* codant pour la lactate déshydrogénase, avec une prédiction de régulation positive en accord avec les résultats précédents. Comme déjà précisé dans la bibliographie, le gène *ldh* est régulé positivement par CcpA chez *L. lactis* dans le cadre de son organisation dans l'opéron *las* (avec *pfk* et *pyk*). La fonctionnalité de ce *cre* chez *S. pneumoniae* est donc très probable, la production d'acide lactique étant la réponse majeure de l'activité métabolique. Les séquences *cre* étant pseudo palindromiques, la séquence inverse du *cre-ldh* présente elle aussi 12 pb homologues au consensus, son positionnement suggérant une régulation positive CcpA dépendante des gènes *gyrA* et *srtA*, organisés en opéron. Cette prédiction est donc elle aussi en accord avec les résultats d'expression obtenus. Le même type d'organisation divergente existe pour les gènes impliqués dans le métabolisme du galactose, avec le positionnement d'un site *cre* potentiel en accord avec les niveaux d'expression obtenus. Ainsi, CcpA régulerait négativement *galK* et *galT* impliqués dans la métabolisation du galactose, et activerait le répresseur codé par *galR*. Pour les gènes du métabolisme du glycogène, eux aussi réprimés en phase exponentielle de croissance, un *cre* potentiellement répresseur a là encore été identifié.

Concernant les gènes glycolytiques, tous les *cre* identifiés devant les gènes d'intérêt ont des positions en accord avec la prédiction, à savoir activateurs pour les gènes *pfkA*, *pykF*,

eno, *fba* et *tpi* (table 20). Pour ce dernier, l'organisation divergente avec *lytC* suggère que le *cre* complémentaire est lui aussi activateur, confirmant la prédiction.

Par ailleurs, plusieurs gènes dont une prédiction d'activation par CcpA a été formulée possèdent des *cre* potentiels dont le positionnement est en désaccord. C'est le cas du gène *ackA* codant pour l'acétate kinase, pour lequel un *cre* potentiel quasi-parfait possède une position de répression (table 20). Toutefois, l'existence d'une séquence *cyb* en amont de la séquence -35 suggère une intervention probable de *codY* de façon analogue à *B. subtilis* (Shivers *et al.*, 2006), compliquant ainsi la régulation et l'interprétation du résultat obtenu. Une situation équivalente existe pour les deux gènes *ptsH* et *ptsI* organisés en opéron, avec un *cre* potentiellement répresseur bien que le CG central soit manquant.

✓ Métabolisme azoté

Comme présenté en table 20 et en figures 39E / 39F, les gènes impliqués dans l'assimilation et la synthèse des acides aminés branchés (opérons *liv* et *ilv*) présentent deux *cre* activateurs potentiels possédant 13 pb homologues au consensus. Pour ces deux opérons, la présence de séquences *cyb* confirme par ailleurs leur dépendance vis-à-vis du régulateur CodY, suggérant dans le cas de l'opéron *ilv* une régulation similaire à celle observée chez *B. subtilis* (co-régulation CcpA / CodY). L'analyse de la région promotrice du gène *codY* a révélé la présence d'un *cre* potentiel, positionné en aval de la séquence -35 et présentant un seul mésappariement vis-à-vis du consensus (table 20 et figure 39D). L'existence de ce *cre* renforce donc l'hypothèse d'une répression directe via CcpA, à la vue des niveaux d'expression obtenus pour ce gène.

✓ Conclusion : CcpA, régulateur global de la physiologie du pneumocoque ?

L'analyse bioinformatique a permis de mettre en évidence un nombre significatif de sites *cre* potentiels, dont la majorité possède un positionnement en accord avec la régulation CcpA-dépendante proposée. Bien que la fonctionnalité de ces différents sites n'ait pas encore été démontrée, les données obtenues nous indiquent (à ce stade de l'analyse) que CcpA pourrait jouer un rôle global dans la régulation de la physiologie du pneumocoque (figure 40). En effet, les résultats montrent que CcpA semble contrôler positivement l'activité glycolytique de *S. pneumoniae*, ainsi que le métabolisme des acides aminés branchés (en

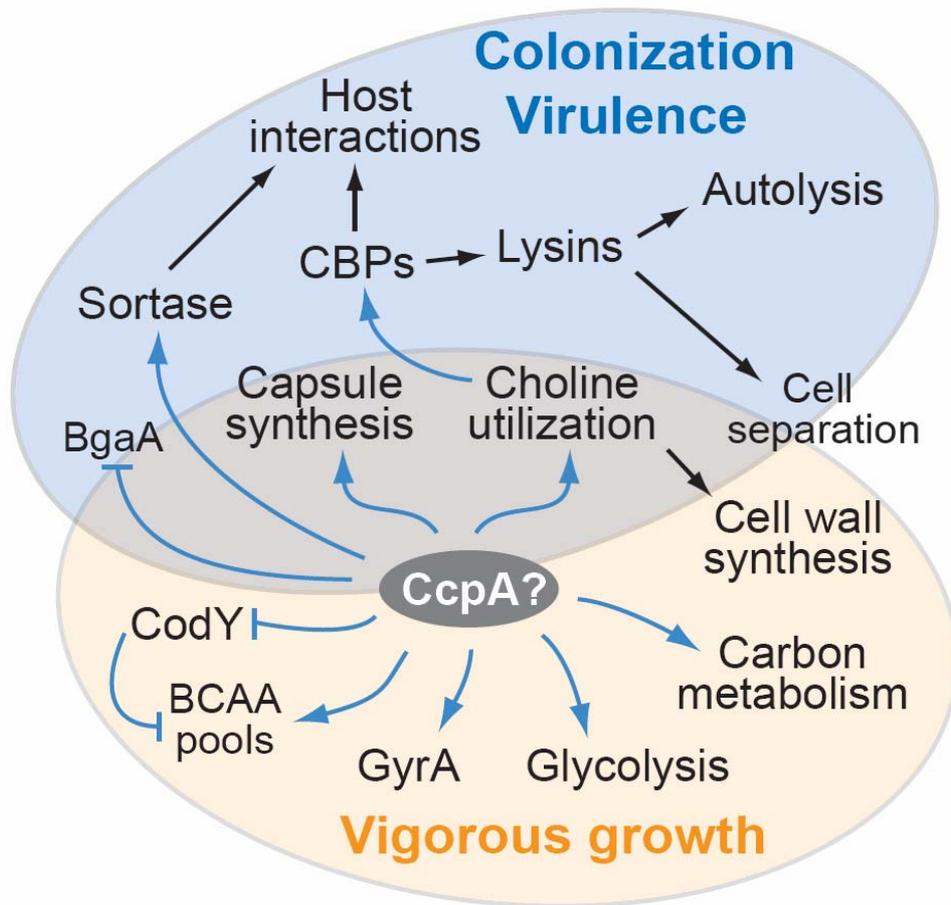


Figure 40. CcpA : un régulateur central de la physiologie du pneumocoque? Les flèches bleues et noires indiquent respectivement une régulation potentielle directe ou indirecte.

interaction avec CodY). De plus, l'existence d'un site *cre* répresseur devant CodY suggère pour la première fois un contrôle négatif direct via CcpA. Un tel contrôle serait en accord avec le besoin pour la cellule d'utiliser de façon optimale différents acides aminés indispensables, pendant la phase exponentielle de croissance, CodY étant un répresseur de leur assimilation et de leur synthèse. L'observation intéressante d'un contrôle potentiel de l'ADN gyrase renforce l'hypothèse du caractère global de CcpA, l'action de cette enzyme au cours du processus transcriptionnel permettant le contrôle de nombreux promoteurs dont l'activité dépend du niveau de surenroulement de l'ADN. Enfin, le contrôle potentiel du métabolisme de la choline par CcpA suggère un contrôle indirect de la synthèse de la paroi, dont la mise en place est étroitement liée la synthèse des acides teichoïques (cf. bibliographie, paragraphe III.2.3). Par ailleurs, les données obtenues semblent indiquer que la virulence est étroitement connectée à la physiologie du pneumocoque, et ce par l'intermédiaire de CcpA. En effet, CcpA pourrait directement intervenir sur le mécanisme de synthèse capsulaire, mais aussi dans le métabolisme de la choline auquel sont liés différents aspects de la virulence, via les choline binding proteins. Au-delà, le contrôle direct ou indirect de différentes protéines de surface comme BgaA ou SrtA suggère que la physiologie est un des éléments clés de l'interaction avec l'hôte.

Pour conclure sur ces résultats, je dirai que l'analyse transcriptomique couplée à la recherche de sites *cre* suggère un rôle central pour CcpA dans le contrôle de la croissance et de la virulence de *S. pneumoniae*. Cette implication potentielle de CcpA renforce l'hypothèse d'un lien entre activité du métabolisme carboné et développement de la virulence, déjà envisagée par Deutscher et ses collaborateurs (Deutscher *et al.*, 2005). Selon eux, ce lien n'est pas surprenant dans la mesure où les microorganismes pathogènes sont susceptibles de rencontrer des changements énormes dans la disponibilité en source carbonée, et ce au cours des processus de colonisation et d'infection. Ainsi, la variabilité de la disponibilité en carbone pourrait constituer un signal permettant « d'allumer » ou « d'éteindre » un nombre important de gènes, conférant à la bactérie la capacité d'adaptation à son environnement.

I.2.5 Expérimentations en cours pour la validation de notre hypothèse

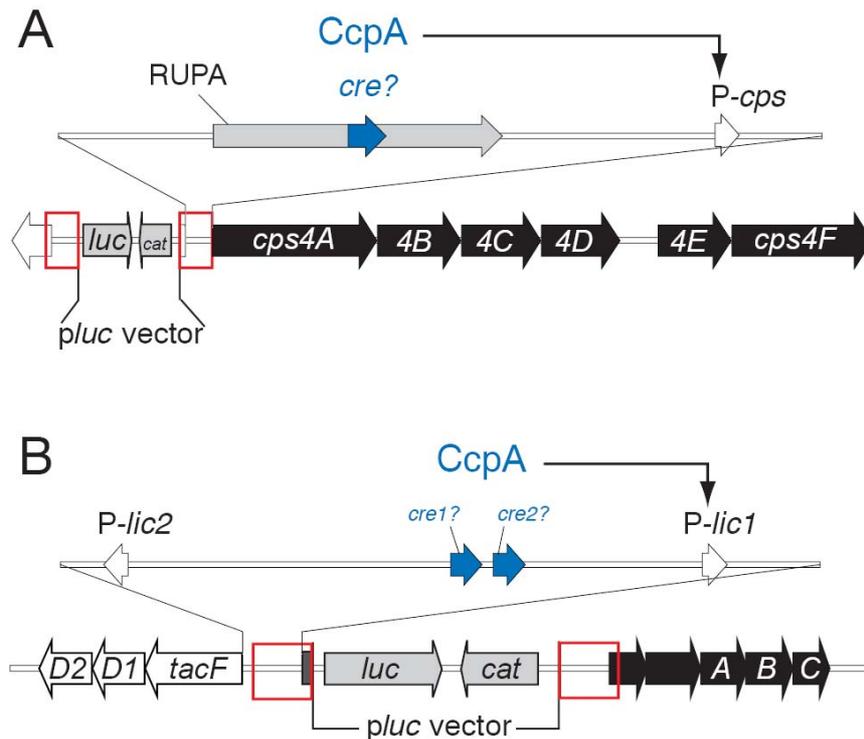


Figure 41. Structures chromosomiques résultant de l'intégration des constructions plasmidiques. A, opéron *cps*, B, opéron *lic1*. Les rectangles rouges indiquent les fragments ciblés par le plasmide, dupliqués au moment de l'intégration (insertion duplication). *luc*, gène de la luciférase, *cat*, gène de résistance au chloramphénicol.

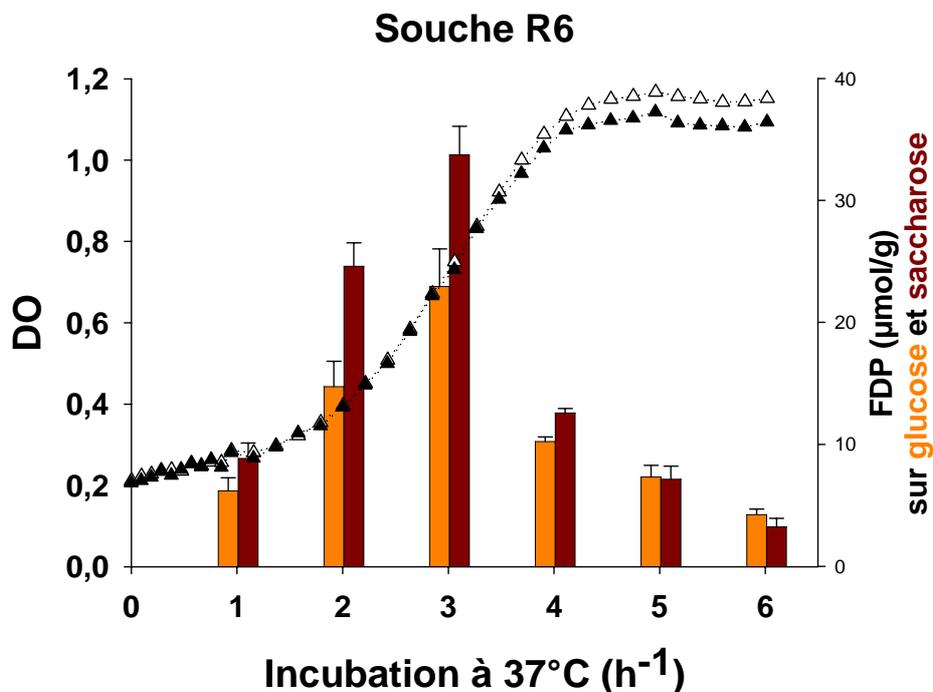


Figure 42. Profils d'accumulation du FDP et de croissance pour la souche R6 en milieu M17, supplémenté en glucose ou saccharose (12 g/l). Croissance, triangles (pleins = glucose et vide = saccharose).

I.2.5.1 Stratégie expérimentale

En regard des résultats obtenus jusqu'ici, nous sommes actuellement en train d'évaluer le niveau d'implication de CcpA dans le contrôle de l'expression des opérons *cps* et *lic1*, pour lesquels les mécanismes de régulation sont encore mal compris. Dans ce cadre, des fusions transcriptionnelles avec le gène codant pour la luciférase (*luc*) ont été réalisées, l'activité du gène *luc* pouvant être mesurée en temps réel dans les cellules de *S. pneumoniae* R6 (cf. Matériel et Méthodes). La luciférase utilise l'ATP intracellulaire pour convertir son substrat, la luciférine, en oxyluciférine provoquant l'émission de photons, ce qui signifie que ce gène n'est plus exprimé lors de l'atteinte de la phase stationnaire (chute de l'activité métabolique). La souche R6 constitue un modèle de choix pour cette étude, étant donné qu'elle est non capsulée, et donc facilement transformable via l'induction du mécanisme de compétence. Le clonage des régions promotrices des opérons *lic1* et *cps* (provenant de la souche de sérotype 4 de Sanofi-Pasteur) avec le plasmide contenant le gène *luc* a permis la transformation de la souche R6, aboutissant aux constructions *cps::luc* et *lic1::luc*. Les structures chromosomiques ainsi obtenues sont présentées en figure 41. L'ensemble des souches, plasmides et primers utilisés pour la réalisation de ces clones est listé en annexe 6.

Etant donné que l'objectif est d'évaluer la réponse des constructions vis-à-vis de la concentration en FDP intracellulaire, il était nécessaire de trouver des conditions dans lesquelles la souche R6 présentait des profils d'accumulation similaires aux souches pathogènes. Après plusieurs essais, le milieu M17 (Becton Dickinson) utilisé classiquement pour la croissance des Streptocoques lactiques s'est avéré le meilleur compromis (vis-à-vis du milieu industriel pour lequel la souche R6 a montré des problèmes de croissance). De plus, l'utilisation de glucose ou de saccharose comme source de carbone permet d'observer des niveaux d'accumulation en FDP différents, et donc d'avoir deux conditions tests. Ce différentiel d'accumulation du FDP peut s'expliquer par le fait que le saccharose alimente simultanément la glycolyse à deux niveaux, à savoir le G6P et le F6P (seulement le G6P en glucose), favorisant ainsi l'accumulation du FDP (figure 6, chapitre Bibliographie). Notons que la concentration en glucose et saccharose utilisée est de 12 g/l, concentration équivalente à celle utilisée dans le milieu industriel. Les profils de FDP obtenus dans la souche R6 en milieu M17 sont présentés en figure 42, montrant notamment que le changement de

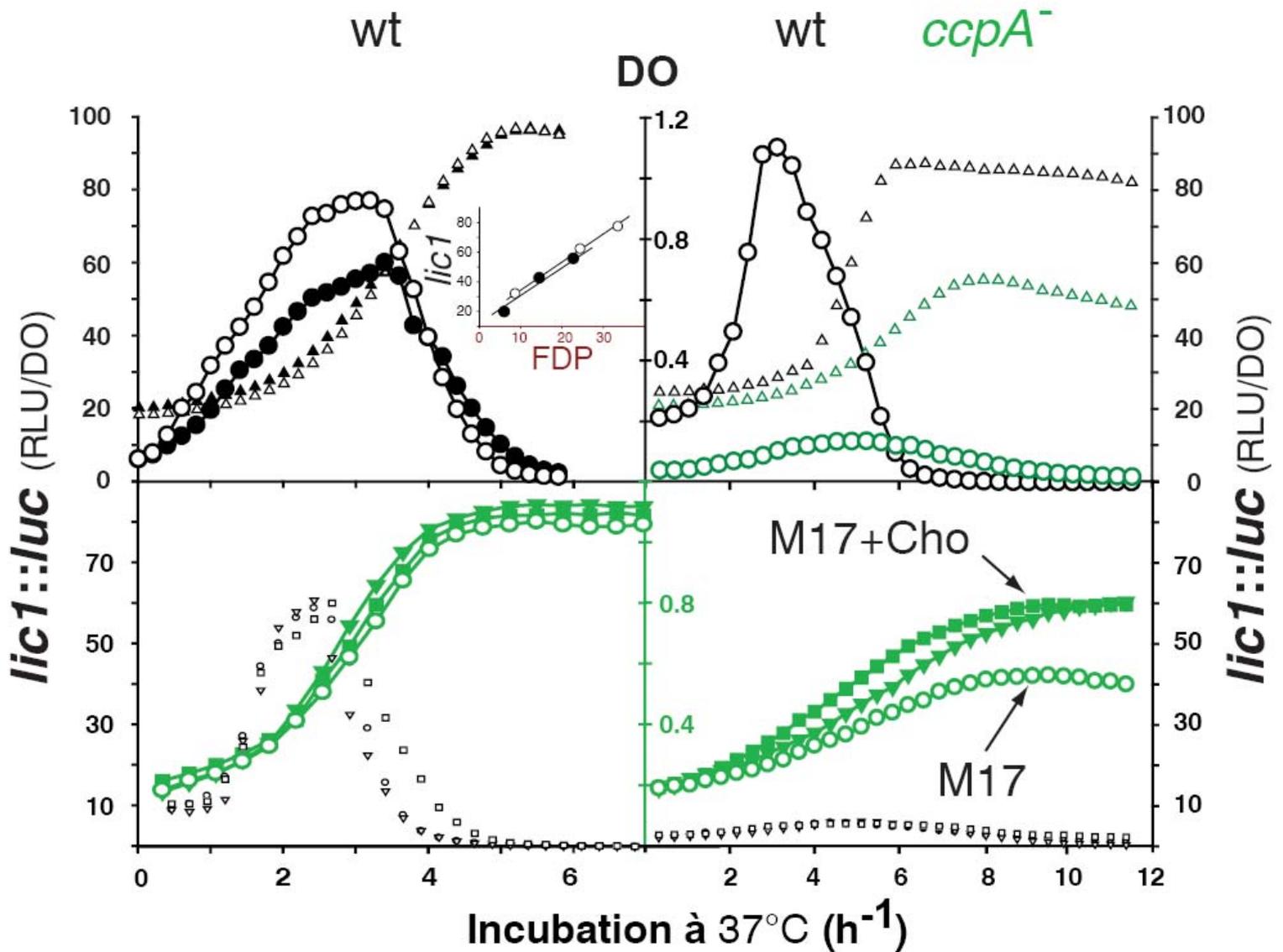


Figure 43. Analyse transcriptionnelle *in vivo* de la régulation de l'opéron *lic1* (construction *lic1::luc*) en contexte sauvage (wt = wild type) et *ccpA*⁻. La croissance (DO_{492nm}) et l'activité luciférase (RLU/DO) ont été suivies durant la culture de la souche sauvage et du mutant *ccpA*⁻ en milieu M17, contenant du glucose à 12 g/l (symboles pleins) ou du saccharose à 12 g/l (symboles vides).

- ❖ **Panneaux du haut** : expression de *lic1* = cercles, croissance = triangles. **A gauche**, cellules sauvages avec l'encadré présentant la corrélation entre l'expression de *lic1* et la concentration en FDP. **A droite**, comparaison entre la souche sauvage (en noir), et le mutant *ccpA*⁻ (en vert)
- ❖ **Panneaux du bas** : croissance = symboles verts, expression de *lic1* = symboles noirs. Cercles = M17 classique, triangles = M17 + 1,25 g/l de chlorure de choline, et carrés = M17 + 5 g/l de chlorure de choline. **A gauche**, cellules sauvages. **A droite**, mutants *ccpA*⁻. 5 g/l représente 100 fois la concentration minimale requise pour une croissance non limitante (Yother *et al.*, 1998)

source de carbone n'a pas d'impact significatif sur la croissance des cellules.

I.2.5.2 Impact de CcpA sur la transcription de l'opéron *licI*

✓ Corrélation entre l'expression de *licI* et la concentration en FDP

La souche portant la fusion *licI::luc*, nommée R2137, a été incubée en milieu M17 en présence de glucose ou de saccharose, l'activité luciférase et la DO ayant été suivies tout au long de la culture. Les résultats obtenus sont présentés en figure 43 (panneau en haut à gauche). Pour des croissances équivalentes ($\mu_{\max} \approx 0,75 \text{ h}^{-1}$), la réponse de la luciférase se caractérise par une augmentation de l'expression de *licI* atteignant un maximum vers 3 h de culture, suivie d'une décroissance progressive aussi bien en glucose qu'en saccharose. De plus, cette réponse est graduelle en fonction de la source de carbone utilisée, le maximum d'activité luciférase obtenu en saccharose étant environ 1,25 fois plus élevé qu'en glucose. Comme présenté en encadré sur la figure 43, l'expression de *licI* est strictement parallèle à l'accumulation du FDP en phase exponentielle de croissance, les coefficients de corrélation étant proche de 0,99 dans les deux cas. Ainsi, ces premiers résultats montrent le parallèle entre activité du métabolisme central et expression de *licI*, allant en faveur d'une régulation de type CcpA-dépendante. Toutefois, une telle observation n'est pas suffisante, et nécessite maintenant l'évaluation de l'impact de la mutation de CcpA sur les profils obtenus.

✓ Mutation de *ccpA* : croissance altérée et chute de l'activité transcriptionnelle de *licI*

Le même type de manipulation a été réalisé en utilisant une version *ccpA⁻* (*ccpA* muté) de R2137, nommée R2145 (cf. paragraphe VI.4, Matériel et Méthodes). La comparaison de séquence entre la version sauvage et mutée du gène *ccpA* est présentée en Annexe 9. Les profils d'expression et de croissance sont présentés en figure 43 (panneau en haut en droite). La première observation est l'existence d'une croissance fortement altérée aussi bien en glucose qu'en saccharose (sur la figure en saccharose), le μ_{\max} atteignant une valeur proche de $0,2 \text{ h}^{-1}$, soit moins du tiers du μ_{\max} obtenu pour la souche sauvage. Cette observation confirme d'ores et déjà le caractère de régulateur global de CcpA.

Concernant l'expression de *lic1*, la mutation de *ccpA* se traduit par une chute d'un facteur 10 environ, vis-à-vis de la souche sauvage, suggérant ainsi une régulation positive de *lic1* de type CcpA-dépendante.

✓ Le besoin en choline semble plus important dans les souches *ccpA*⁻

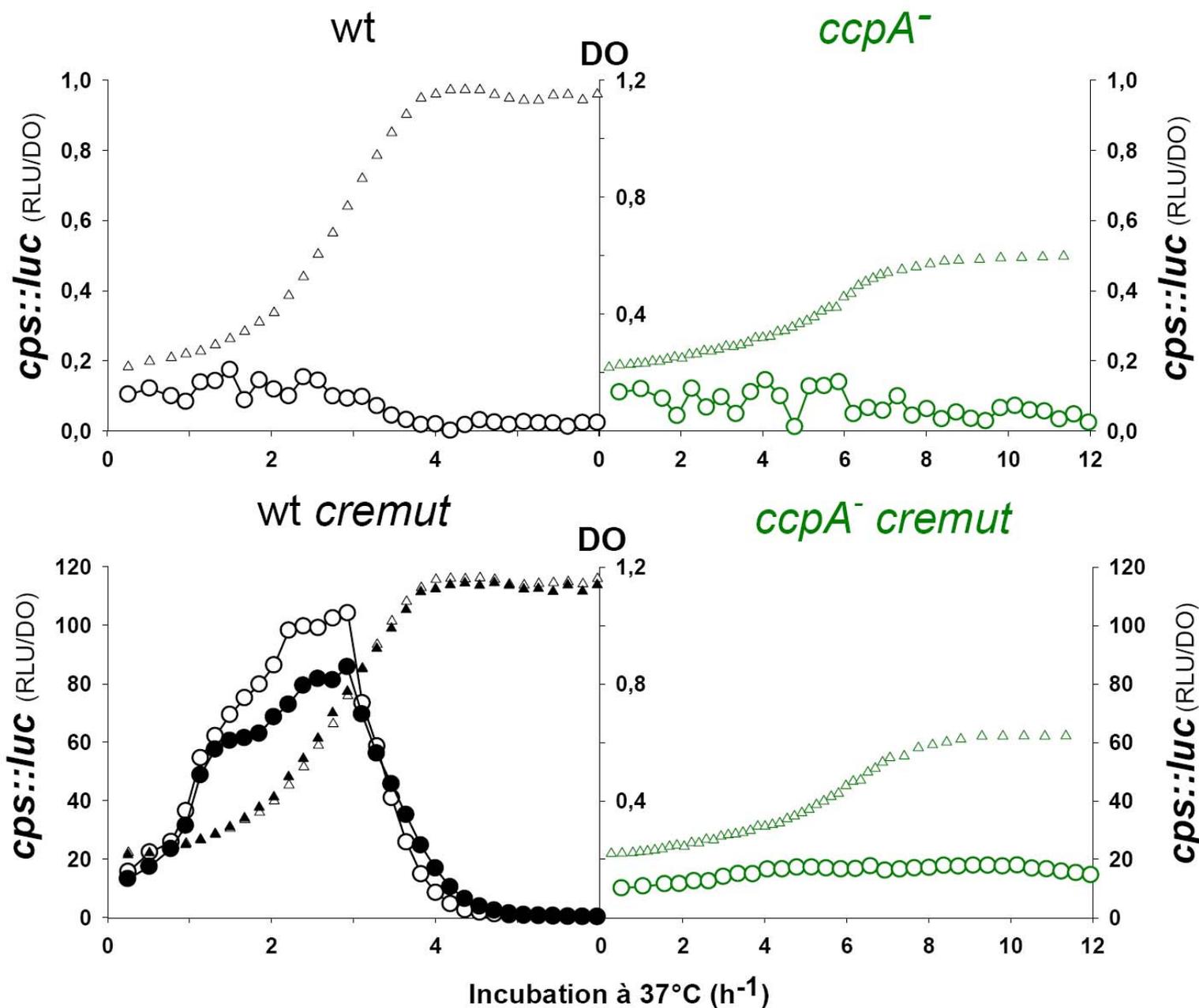
Afin de renforcer notre hypothèse sur l'implication de CcpA dans le contrôle de l'assimilation de la choline via l'expression de *lic1*, la manipulation la plus simple a été d'évaluer l'impact de la supplémentation en choline du milieu M17 sur la croissance des mutants *ccpA*⁻. Le milieu M17 ne possède pas de supplémentation particulière en choline, mais contient de l'extrait de levure (2,5 g/l) qui amène très probablement la concentration minimale nécessaire à la croissance dans ces conditions. Comme présenté en figure 43 (panneau en bas à droite), la supplémentation en choline se traduit par une amélioration graduelle de la croissance des mutants *ccpA*⁻, sans modification de l'expression de *lic1*. Plus précisément, on peut observer une augmentation significative du taux de croissance, avec un μ_{\max} atteignant 0,3 h⁻¹ pour 1,25 g/l de choline, et 0,38 h⁻¹ pour 5 g/l de choline (0,2 h⁻¹ sans choline). Toutefois, la biomasse atteinte reste plus faible qu'en contexte sauvage, démontrant que CcpA a un aspect pléiotrope (contrôle du métabolisme azoté par exemple). Un contrôle réalisé sur la souche sauvage présenté en figure 43 (panneau en bas à gauche) montre que la supplémentation en choline ne se traduit plus par une modification de la croissance. Ainsi, les résultats nous indiquent que le besoin en choline est augmenté dans les mutants *ccpA*, démontrant que ce régulateur est impliqué de façon directe ou indirecte dans l'assimilation de la choline. Enfin, le même type de manipulation a été réalisé avec un mutant *ciaR*⁻ de notre fusion *lic1::luc* (résultats présentés en Annexe 7), le régulateur CiaR étant connu pour contribuer à la régulation positive du promoteur P1 en phase stationnaire (Halfmann *et al.*, 2007). Comme attendu, la mutation de *ciaR* n'affecte pas l'expression de *lic1* vis-à-vis de la souche sauvage, pendant la phase exponentielle de croissance (*luc* ne reportant plus lors de l'atteinte de la phase stationnaire). De plus, la croissance n'est quasiment pas affectée pour ce mutant, et la supplémentation en choline n'a donc aucun effet.

✓ Analyse de la fonctionnalité des séquences *cre1-lic1* et *cre2-lic2*

L'évaluation de la fonctionnalité des deux *cre* potentiels identifiés en amont de l'opéron *lic1* doit permettre de savoir si l'impact de CcpA a lieu de façon directe. Dans ce cadre, une stratégie de mutagenèse des deux sites est actuellement en cours de réalisation. Des travaux préliminaires, réalisés par une collaboration avec l'équipe de R. Hakenbeck en Allemagne (équipe ayant identifié la contribution de CiaR sur l'expression de *lic1*), semblent indiquer qu'aucun des deux sites n'a d'effet sur l'expression de *lic1* ce qui suggère qu'il s'agirait plutôt d'une régulation de type indirect. Toutefois, ces essais n'ont pas utilisé le même gène reporter (fusions *lacZ*), et nous sommes actuellement en train de réaliser les constructions dans notre contexte génétique. Par ailleurs, un deuxième contrôle est en cours de réalisation pour nos mutants *ccpA*⁻, en lien avec la chute d'activité observée vis-à-vis de la souche sauvage. En effet, la réaction catalysée par la luciférase utilise l'ATP intracellulaire disponible, et il est donc nécessaire de savoir si ce pool d'ATP n'est pas affecté par la mutation du gène *ccpA*. Ce contrôle consiste à placer dans des souches contenant des fusions *recA::luc* la mutation *ccpA*⁻, le gène *recA* (recombinase A) ayant une réponse bien caractérisée et n'ayant pas de raisons particulières d'être régulé par CcpA. Dans le cas où une chute d'expression serait observée pour ce gène, cela signifierait que CcpA agit directement sur l'ATP intracellulaire, suggérant une influence de l'énergétique intracellulaire sur l'expression de *lic1*. Une étude réalisée chez *B. subtilis* a cependant montré que la mutation de *ccpA* ne se traduisait pas par une modification du pool d'ATP (Ludwig *et al.*, 2002). De plus, une telle hypothèse n'expliquerait pas pourquoi les mutants *ccpA*⁻ présentent une exigence en choline plus élevée.

I.2.5.3 Impact de CcpA sur la transcription de l'opéron *cps*

Une approche similaire à celle présentée précédemment a été utilisée pour évaluer l'impact de CcpA sur l'expression de l'opéron capsulaire (figure 44). A partir de la souche sauvage contenant la fusion *cps::luc* (nommée R2112 ou wt), une série de mutants a été réalisés avec pour point de départ une mutagenèse du site *cre* identifié dans le RUPA, générant la souche 2113 (wt *cremut*). Dans un deuxième temps, la mutation du gène *ccpA* dans les souches R2112 et R2113 a été réalisée générant respectivement les souches R2124 (*ccpA*⁻) et R2126 (*cremut*, *ccpA*⁻). Les protocoles utilisés pour leur réalisation sont précisés dans le chapitre Matériel et Méthodes.



TGWNANCGNTNWCA consensus

AGAAATCGATTTGA *cre-cps wt*

ACTcgatcgGACAC *cre_{mut}-cps*

Figure 44. Analyse transcriptionnelle *in vivo* de la régulation de l'opéron *cps* (construction *cps::luc*) en contexte sauvage (wt = wild type), *ccpA*⁻, *cre* muté (*cremut*) et *cre* muté *ccpA*⁻. La croissance (DO_{492nm}) et l'activité luciférase (RLU/DO) ont été suivies durant la culture des différentes souches en milieu M17, contenant du glucose (symboles pleins) ou du saccharose à 12 g/l (symboles vides). Pour l'ensemble des données, expression de *licI* = cercles, croissance = triangles. L'encadré présente la corrélation entre l'expression de *cps* et la concentration en FDP sur glucose et saccharose, pour la version *cre* muté en contexte sauvage. Concernant les sites *cre*, les bases différant du consensus sont soulignées, les bases en minuscule dans la séquence mutée correspondant à l'insertion d'un site de restriction PvuI.

✓ Une absence quasi-totale de réponse en contexte *cre* sauvage

De la même manière que les fusions *lic1::luc*, la souche contenant la fusion *cps::luc* (R2112) a été cultivée en milieu M17 avec suivi de l'activité luciférase et de la DO. De façon surprenante, une expression extrêmement faible de *cps* est observée dans la souche contenant le site *cre* sauvage, bien que la croissance se déroule de façon tout à fait normale. Une réponse similaire a été observée pour plusieurs clones de cette construction, suggérant qu'il ne s'agit pas d'un problème au niveau de l'insertion duplication (vérifiée en séquençage par ailleurs). Une comparaison entre la luminescence brute de cette souche et celle obtenue dans le milieu M17 seul (Annexe 8) montre que les valeurs sont relativement proches, signifiant que le gène *luc* ne serait pas fonctionnel. Bien que la luminescence brute soit très faible, on constate cependant un «pic» vers 3 h de culture (là où la réponse serait a priori la plus forte), avec un léger différentiel entre glucose et saccharose laissant supposer que le gène *luc* pourrait en réalité être intact. Il est cependant difficile de conclure sur un tel résultat à ce stade de l'analyse, et je reviendrai plus loin sur les différents contrôles en cours à ce sujet. Dans cette situation paradoxale, le mutant *ccpA*⁻ possède une expression très faible et équivalente à la souche sauvage (figure 44). La croissance est pour sa part fortement altérée, en accord avec le résultat déjà obtenu pour le mutant *ccpA*⁻ de la construction *lic1::luc*, ce qui confirme l'impact majeur de ce régulateur sur la croissance.

✓ Une réponse attendue pour le *cre* sauvage obtenue dans le contexte *cre* muté

Comme présenté en figure 44, la réponse obtenue pour la souche *cre* mutée en contexte sauvage est à nouveau inattendue, puisque celle-ci se traduit par une augmentation du niveau d'expression de *cps* parallèle et directement corrélée aux niveaux de FDP (coefficients de corrélation # 0,99). De plus, on détecte de la même manière que pour l'opéron *lic1* une réponse plus élevée en saccharose qu'en glucose, en lien direct avec les profils d'accumulation obtenus dans la souche R6. La même souche placée dans le contexte *ccpA*⁻ présente logiquement une croissance fortement altérée, ainsi qu'une chute de l'expression d'un facteur 8 environ. Assumant que CcpA n'affecte pas le pool d'ATP intracellulaire (en cours de vérification), la réponse obtenue dans le contexte *cre* muté semble donc CcpA dépendante. Ainsi, le contexte *cre* muté présente la réponse présumée du contexte sauvage, et inversement.

✓ Interprétation des résultats

L'analyse des résultats obtenus pour l'expression de l'opéron *cps* n'est donc pas cohérente avec l'hypothèse d'une régulation directe CcpA-dépendante, via le *cre* potentiel identifié dans le RUPA. Le contexte sauvage donne une absence totale d'expression, et le fait de mutagéniser le site *cre* fait apparaître la réponse que l'on pouvait attendre pour le *cre* intact. En analysant de plus près la structure secondaire du RUPA présentée en figure 45, nous avons constaté que le site *cre* était situé dans une des boucles pouvant jouer le rôle de terminateur transcriptionnel. Ainsi, la première interprétation est de dire que la mutagénèse du site *cre* pourrait déstructurer le RUPA et annuler son effet terminateur, laissant apparaître un transcrit provenant de l'amont dont l'expression pourrait être CcpA-dépendante. Des essais préliminaires réalisés en RT-PCR sur les 2 kb amont de *luc*, dans notre construction, ne semblent pourtant pas aller dans le sens d'une telle supposition (données non présentées). Quoiqu'il en soit, une telle modification du RUPA pourrait fortement perturber le contexte d'expression.

Ainsi, plusieurs hypothèses sont avancées à ce stade de l'analyse permettant de mieux comprendre la situation dans laquelle nous nous trouvons. Tout d'abord, le fait d'avoir une expression extrêmement faible pour la construction ayant le *cre* sauvage est étonnant, car cela suggère que le gène reporter présente un dysfonctionnement. En effet, bien que les différentes PCR de vérification de l'insertion duplication soient correctes, nous vérifions actuellement si des mutations ponctuelles se sont glissées dans le gène *luc* de notre construction sauvage, pouvant provoquer une quasi-absence de réponse. Toutefois, un contrôle indépendant a consisté à prendre l'ADN chromosomique de la souche *cremut* (R2113), et à transformer une souche réceptrice n'ayant ni fusion ni mutation du site *cre* : sur 7 transformants sélectionnés de façon aléatoire et testés en luminométrie, on constate toujours une corrélation entre *cre* muté et activité luciférase significative (5 sur 7, les deux ne présentant pas de réponse ayant récupéré un *cre* sauvage). Ainsi, la question sur la validité de nos constructions ne peut donc être remise en doute, la question devant se poser au-delà, à savoir le contexte génétique dans lequel nous travaillons. La région contenant l'opéron capsulaire dans la souche R6 est fortement altérée, ce qui peut remettre en cause l'utilisation de cette souche pour l'analyse de l'expression de *cps*. En effet, le caractère non pathogène de la souche est lié à une délétion de 7,5 kb, englobant 3 des 4 gènes de régulation et plusieurs gènes de synthèse. Ainsi, le seul gène de régulation présent est *cpsA*, mais tronqué au niveau de l'extrémité 3'. Insérer des

fusions transcriptionnelles dans un tel contexte doit probablement influencer sur les résultats obtenus, des investigations supplémentaires étant donc essentielles. Enfin, la dernière hypothèse qui me semble la moins probable serait de considérer que le *cre* mutagénisé serait reconnu par CcpA, le *cre* sauvage ne l'étant pas. Dans tous les cas, ce point a été pris en compte pour les nouveaux mutants que nous sommes en train de générer.

I.2.5.4 Bilan des travaux en cours et nouvelles stratégies

L'ensemble des résultats obtenus à ce jour, concernant l'analyse de l'expression *in vivo* des opérons *licI* et *cps*, montre toute la difficulté de compréhension des mécanismes de régulation mis en jeu. Concernant l'opéron *licI*, l'hypothèse d'une régulation CcpA-dépendante est fortement appuyée par une exigence accrue en choline des mutants *ccpA*⁻. D'autre part, la réponse graduelle à la source carbonée, ainsi que la chute d'expression de *licI* en contexte *ccpA*⁻ renforce cette hypothèse. Il reste donc à déterminer si la réponse obtenue dans les mutants *ccpA*⁻ est la conséquence d'une régulation directe, ou indirecte, via le contrôle du pool d'ATP intracellulaire par exemple. Ces présomptions sont valables pour l'opéron *cps* lui aussi, bien que les résultats aient été observés dans le contexte *cremut*. En effet, même si l'activité n'est présente qu'en contexte *cre* muté, celle-ci semble à première vue dépendante de CcpA, et il sera nécessaire de localiser cette régulation si elle existe.

Face à ces interrogations, différentes stratégies ont été mise en place, ayant pour objectif premier d'évaluer clairement le comportement de la souche sauvage, et par la suite l'impact des différentes mutations. Dans ce cadre, deux contextes génétiques différents de la souche R6 « classique » ont été choisis pour intégrer nos différentes fusions (aussi bien *cps::luc* que *licI::luc*). Le premier est une souche de *S. pneumoniae* R6 dont le locus capsulaire a été entièrement délété depuis l'aval du gène *dexB* jusqu'au gène *aliA*. Rappelons que l'ensemble des locus capsulaires des différents sérotypes ont une taille moyenne de 20 kb, et sont toujours positionnés entre ces deux gènes. L'intégration de nos fusions transcriptionnelles dans un tel contexte indépendant devrait permettre de s'affranchir des problèmes rencontrés avec la souche précédente. Par ailleurs, nous allons intégrer nos différentes fusions dans une souche de *S. pneumoniae* D39 non capsulée (la souche D39 étant un sérotype 2 capsulé dont la souche R6 est dérivée). Cette non capsulation provient de la mutation du gène *galU*, codant pour l'UDP-glc pyrophosphorylase (cf. figure 17,

Bibliographie), le locus capsulaire n'étant donc pas affecté. Ainsi, il sera possible d'évaluer les niveaux d'expression dans un contexte où les gènes de régulation sont intacts. Enfin, le caractère pléiotrope de CcpA montre toute la difficulté de travailler dans le contexte muté et donc d'interpréter les résultats, à cause notamment d'une croissance fortement altérée. Une des pistes actuelles consiste à trouver des conditions dans lesquelles ces mutants retrouvent une croissance acceptable, notamment par la supplémentation en certaines sources d'azotes. Quoiqu'il en soit, les résultats obtenus jusqu'ici ne remettent pas en cause notre hypothèse de départ, bien qu'un certain nombre d'éclaircissements soient nécessaires pour arriver à une vision globale des mécanismes de régulation des opérons *cps* et *lic1*.

I.3 Conclusion sur les résultats

En conclusion de cette première partie des résultats, l'utilisation de deux isolats de *S. pneumoniae*, présentant des comportements différents en termes de productivité capsulaire, s'est avérée positive. Au-delà de la production de l'antigène d'intérêt qui concerne plus particulièrement mon travail de thèse, les résultats nous indiquent clairement un lien étroit entre l'activité métabolique de cette bactérie et le contrôle de l'activité transcriptionnelle d'un grand nombre de gènes. Même si différents mécanismes restent encore à approfondir au moment où je rédige cet exposé, la protéine CcpA semble jouer un rôle primordial dans cette connexion, conforté par la forte altération de la croissance observée dans les souches *ccpA*⁻. D'une part, cette protéine est partie prenante du contrôle du métabolisme central du pneumocoque (de la même manière que d'autres bactéries Gram+), aussi bien au niveau du métabolisme carboné que du métabolisme azoté en assurant une croissance vigoureuse. D'autre part et c'est là le point le plus intéressant, elle intervient de façon directe ou indirecte dans le contrôle de la virulence, conférant au pneumocoque une capacité d'adaptabilité environnementale indispensable à sa dynamique de colonisation et d'infection. L'ensemble des résultats a ainsi permis d'avoir une meilleure idée du comportement physiologique des souches dans les conditions de production vaccinale. Ce travail de compréhension était indispensable, ne serait-ce que pour avoir une idée claire du comportement fermentaire de la bactérie, dans l'optique d'une amélioration du procédé industriel. Ce travail a donc constitué une base solide pour la deuxième étape de ma thèse, qui a consisté à cibler et évaluer l'impact de modifications nutritionnelles sur le procédé de production du vaccin Pneumo 23.

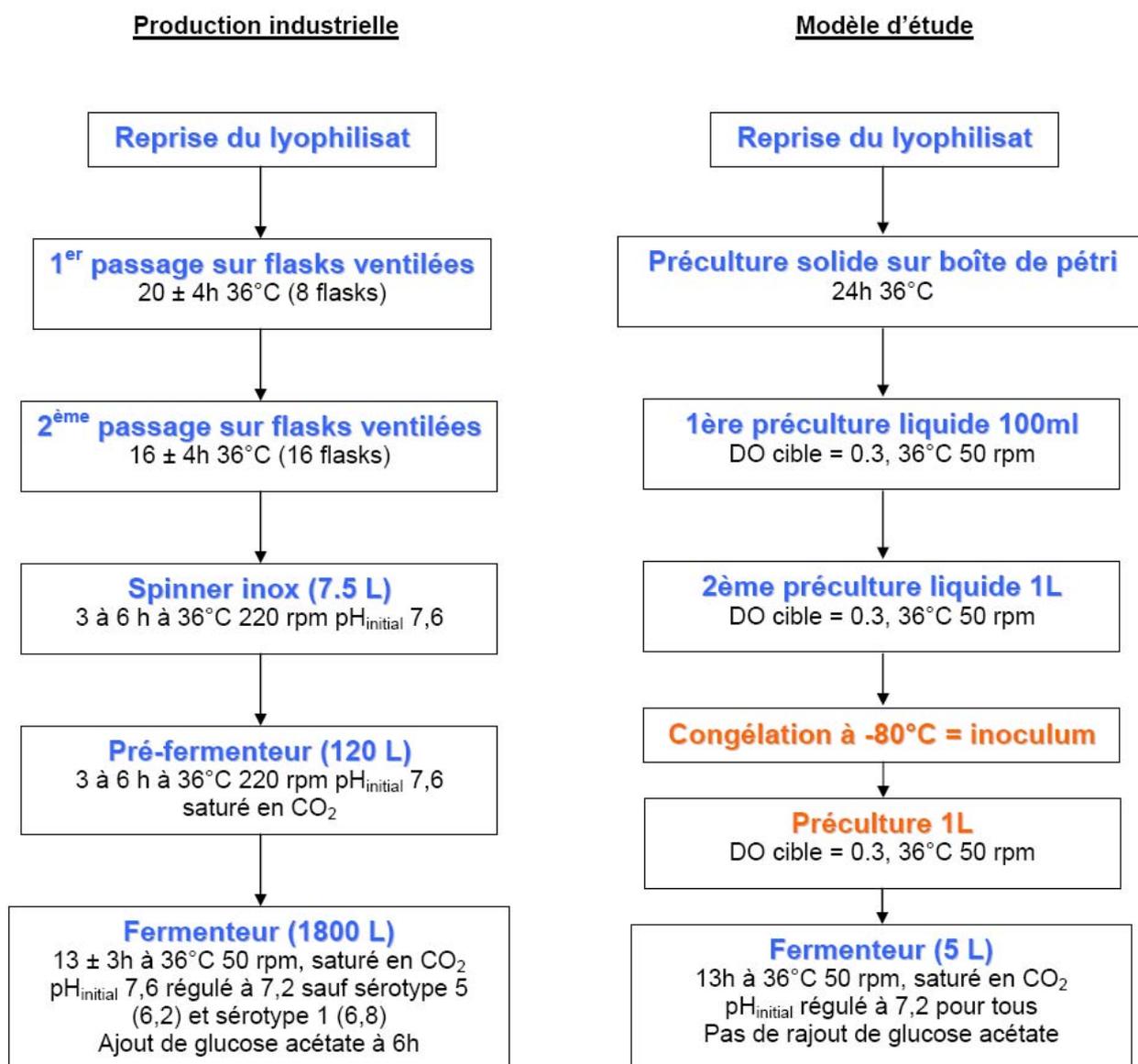


Figure 46. Comparaison du schéma de culture industrielle avec le modèle d'étude mis en place.

II. Application industrielle : amélioration de la productivité en polysaccharide capsulaire

II.1 Stratégie expérimentale

Le travail que je viens de présenter dans la partie précédente nous a permis de mieux appréhender les conditions dans lesquelles *S. pneumoniae* synthétise son polysaccharide capsulaire. La question est maintenant de savoir si cette compréhension est susceptible de nous fournir des pistes sérieuses quant à l'amélioration du procédé de production du vaccin Pneumo 23. Etant donné le peu de données industrielles disponibles, la stratégie a été dans un premier temps de caractériser les différents sérotypes dans un modèle d'étude à échelle réduite (5 l), présentant des conditions analogues à la culture industrielle en termes de milieu et de conduite de la culture. Le choix des sérotypes s'est porté sur le sérotype 4 (modèle d'étude), les sérotypes 5, 8 et 20 identifiés par l'industriel comme ayant des rendements variables en CPS, et enfin le sérotype 33F qui peut produire des CPS de taille (conformité) variable en fonction des lots de production. La figure 46 présente le schéma du modèle d'étude que j'ai utilisé, en comparaison avec le procédé de production standard. L'essentiel a été conservé vis-à-vis des conditions industrielles lors de sa mise en place. Le même milieu de culture a été utilisé selon les préconisations de fabrication, et sauf exception, l'ensemble des paramètres physico-chimiques a été conservé. Etant donné le niveau de variabilité comportemental des différents sérotypes observé en production, il était par ailleurs indispensable d'être reproductible lors des essais. C'est dans ce cadre que j'ai fait le choix d'une stratégie de congélation d'inoculum, permettant d'une part de ne dérouler qu'une seule fois les étapes de préculture, et d'autre part de s'affranchir de la variabilité qui peut exister lors de la reprise d'un lyophilisat. Cela a été réalisé pour chacun des sérotypes. Le pH a lui aussi été standardisé à 7,2 pour l'ensemble des sérotypes étudiés, aussi bien au stade initial que pour sa régulation. Comme présenté précédemment, certains sérotypes possèdent en effet une régulation pH différente sur le procédé de Sanofi-Pasteur (comme le sérotype 5 à pH 6,2), et ce pour des raisons historiques. Le glucose-acétate a quant à lui a été supprimé, puisqu'il ne provoque pas de redémarrage de croissance lors de son ajout (figure 35).

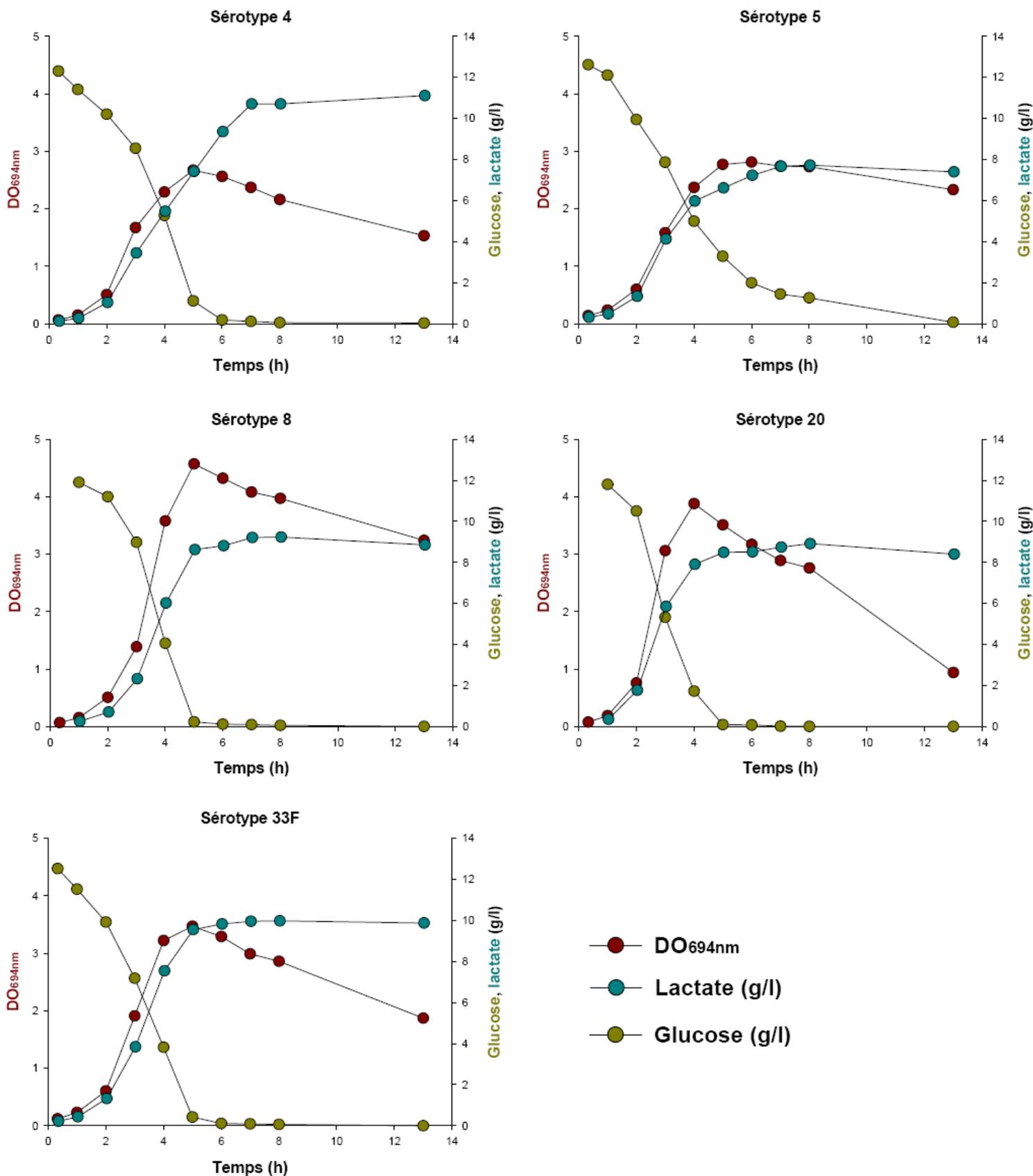


Figure 47. Cultures à l'échelle 5 l dans les conditions standards pour les sérotype 4, 5, 8, 20 et 33F. Suivi macrocinétique de la croissance, du glucose et du lactate.

En effet, l'acétate est probablement toxique à des concentrations élevées pour les bactéries. Enfin, j'ai choisi de me baser sur des DO cibles (début de phase exponentielle proche de 0,3) lors des changements d'étapes, et non sur des contraintes horaires comme cela est effectué en culture industrielle.

L'utilisation de ce modèle s'est révélée fonctionnelle et reproductible à l'usage. De plus, il est représentatif de la culture industrielle, notamment en termes de taux de croissance ou de quantité de biomasse obtenue. Sa mise en place était un pré requis nécessaire dans l'optique d'une modification, l'effet obtenu pouvant être directement imputable à celle-ci. Enfin, le caractère reproductible du modèle m'a permis d'avoir une solide base de travail, puisque l'échantillonnage nécessaire à la réalisation de la partie fondamentale de cet exposé a été effectué avec celui-ci. Je noterai qu'aucune culture réalisée à cette échelle n'a fait l'objet d'une récolte, étant donné les faibles volumes utilisés.

J'utiliserai le terme de conditions standards pour ce modèle, quand il ne présente pas de modifications des paramètres nutritionnels. L'ensemble des données macrocinétiques obtenues lors des différents essais est présenté en Annexes 2, 3 et 4.

II.2 Evaluation du comportement macrocinétique de 5 sérotypes en conditions industrielles standards

II.2.1 Analyse macrocinétique

✓ Croissance et métabolisme

La figure 47 présente les profils obtenus lors de la culture en fermenteur 5 l pour les cinq sérotypes étudiés. Les principales données macrocinétiques concernant ces cultures sont présentées en table 21. De façon générale, on constate pour l'ensemble des sérotypes une phase exponentielle de croissance maintenue durant environ deux heures, au cours de laquelle le taux de croissance maximal se situe entre $0,95 \text{ h}^{-1}$ pour le sérotype 5 et $1,3 \text{ h}^{-1}$ pour le sérotype 20. L'ensemble des sérotypes présente un phénotype standard au microscope de type diplocoque, sauf le sérotype 5 pour lequel les cellules sont organisées en chaînettes. A l'exception du sérotype 5, l'arrêt de croissance est d'une part corrélé à l'épuisement du

Table 21. Principales données macrocinétiques pour les essais à l'échelle 5 l en conditions standards. Taux de croissance (μ), vitesse spécifique de consommation du glucose (q_s), et rendement en biomasse (R_{xs}).

Sérotype	4	5	8	20	33F
μ^a (h^{-1})	1,2 ± 0,01	0,95 ± 0,03	1,25 ± 0,03	1,3 ± 0,01	1,2 ± 0,01
Titre en biomasse maximal (g/l de masse sèche)	1,5 ± 0,06	1,7 ± 0,03	2,5 ± 0,03	2,15 ± 0,02	1,9 ± 0,01
DOmax	2,7 ± 0,2	2,8 ± 0,2	4,6 ± 0,1	3,9 ± 0,1	3,5 ± 0,2
q_s^b ($mmol.g^{-1}.h^{-1}$)	13,3 ± 0,7	10,1 ± 0,6	13,9 ± 1,2	17,1 ± 0,2	14,5 ± 0,4
R_{xs}^c ($g.mol^{-1} glc$)	89,6 ± 1,7	93,2 ± 1,7	84,5 ± 0,9	81,6 ± 0,7	79,6 ± 0,5
Titre max en capsule (g/l)	0,17 ± 0,04	0,04 ± 0,01	0,22 ± 0,07	0,17 ± 0,05	0,24 ± 0,02
Glc résiduel quand $\mu \neq 0$ (g/l)	0,2 ± 0,04	3,3 ± 0,6	0,2 ± 0,06	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,09
Part du glucose en lactate (%)	83,4 ± 1	64,6 ± 2	76,2 ± 2,3	76,6 ± 2,6	82,4 ± 2,9
Part du glucose en formiate (%)	6,2 ± 0,5	17,1 ± 0,8	7,4 ± 1,1	8,1 ± 0,8	8,3 ± 1,4
Part du glucose en acétate (%)	3,1 ± 0,7	7,2 ± 0,4	4,4 ± 0,9	5,1 ± 1,1	4,3 ± 0,7
Part du glucose en éthanol (%)	2,9 ± 0,8	6,6 ± 0,3	4,1 ± 0,5	5,8 ± 0,8	2,9 ± 0,5
Bouclage bilan carbone ^d (%)	94,8 ± 1,4	94,1 ± 1,1	90,8 ± 1,6	93,7 ± 1,8	96,7 ± 1,5

^a : μ est donné par la relation $\ln(\frac{X}{X_0}) = \mu.t$ exprimé en h^{-1} .

^b : q_s donné par $q_s = \frac{rs}{X}$ exprimé en $mmol.g^{-1}.h^{-1}$, avec $rs = \frac{ds}{dt}$ en $mmol.l^{-1}.h^{-1}$.

^c : R_{xs} donné par $R_{xs} = \frac{\mu}{qs}$ exprimé en $g.mol^{-1} glc$.

^d : le bilan carbone ne considère pas les acides aminés, assumant le fait que le carbone fournit par le sucre (glucose) sert majoritairement à l'énergétique, et de façon négligeable à la croissance. Il est obtenu en se basant sur la stoechiométrie des réactions du métabolisme carboné.

glucose, et d'autre part suivi d'une lyse naturelle progressive confirmée par l'observation microscopique et la chute de la DO. Concernant la consommation du glucose, on constate un différentiel important au niveau des vitesses spécifiques, se traduisant par une variabilité des rendements en biomasse. Ainsi, les sérotypes ne présentent pas dans ces conditions la même capacité à consommer le sucre, et à le convertir en biomasse. D'un point de vue métabolique, on remarque dans tous les cas que la production d'acide lactique est majoritaire pour l'ensemble des sérotypes, ce qui confirme le caractère homolactique de *S. pneumoniae*. Le sérotype 5 est le seul pour lequel le profil est atypique, puisque celui-ci présente deux phases de production. La première phase est relativement classique avec production d'acide lactique pendant la phase exponentielle de croissance. Comme indiqué précédemment (cf. paragraphe I.1 des résultats), la chute du taux de croissance ne se traduit pas par un épuisement du glucose, les 3 g/l résiduels étant progressivement métabolisés jusqu'à la fin de la culture selon une phase de post-acidification. De cette manière, ce sérotype semble maintenir une activité métabolique pouvant expliquer d'une part une quantité de biomasse relativement importante malgré le taux de croissance le plus faible, et d'autre part l'absence d'une lyse significative.

Concernant la production de métabolites secondaires (formiate, acétate et éthanol) pour l'ensemble des sérotypes (table 21), celle-ci apparaît au moment où le taux de croissance ralentit, en accord avec la perception d'une limitation nutritionnelle (propre aux bactéries lactiques). L'analyse des bilans carbone (présentés en table 21) montre que cette production de métabolites secondaires représente environ 15 % du glucose consommé, permettant d'obtenir des bilans autour de 95 %. Ces résultats sont en accord avec ce qui est observé classiquement pour les bactéries lactiques. Le sérotype 5 fait encore exception concernant la distribution de son bilan carbone, puisque les métabolites secondaires représentent dans son cas environ 30 % du glucose consommé, avec en conséquence une moindre production d'acide lactique.

✓ Polysaccharide capsulaire et acides teichoïques

Comme présenté en figure 48, la production de polysaccharide capsulaire s'effectue pendant la phase de croissance, et ce en lien direct avec la connexion que j'ai établie entre activité du métabolisme central et induction de la synthèse capsulaire. Le titre maximal en capsule atteint des valeurs comprises entre 0,17 g/l et 0,24 g/l (table 22), à l'exception du

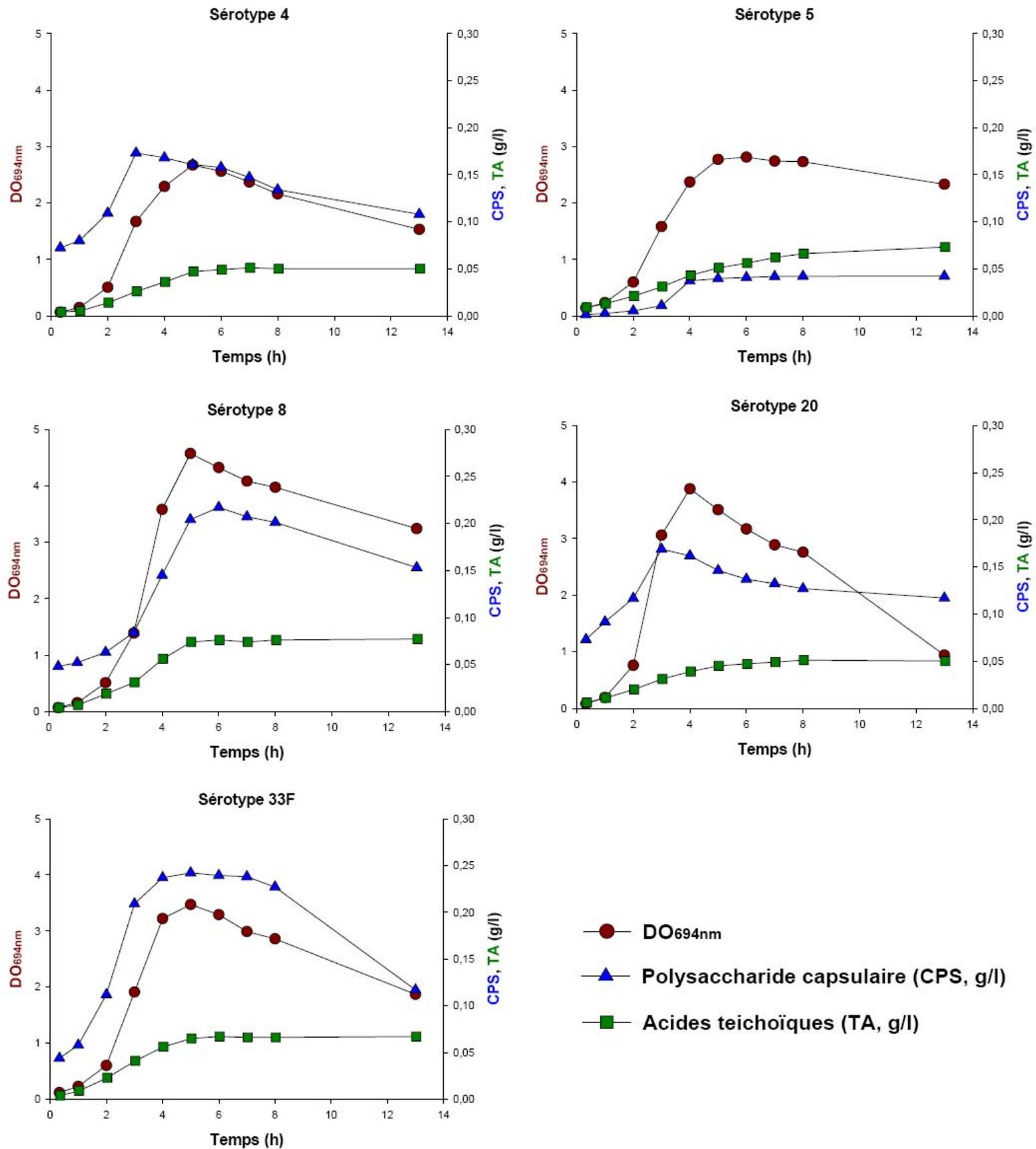


Figure 48. Cultures à l'échelle 5 l dans les conditions standards pour les sérotype 4, 5, 8, 20 et 33F. Suivi macrocinétique de la croissance, du polysaccharide capsulaire et des acides teichoïques.

sérotype 5 pour lequel le titre maximal est environ 5 fois plus faible que la moyenne (en accord avec les données de productivité présentées au paragraphe VI.1 de la bibliographie). Pour ce dernier, l'essentiel de la production capsulaire s'effectue au moment du ralentissement de la croissance et de la transition vers la phase de post-acidification. Pour la majorité des sérotypes, le ralentissement de la croissance et la lyse progressive des cellules se traduit par une chute du titre en capsule et plus particulièrement pour le sérotype 33F, suggérant une dégradation progressive. Ce n'est pas le cas du sérotype 5 pour lequel l'absence d'une lyse cellulaire importante se traduit par un maintien du titre en capsule jusqu'en fin de culture. A titre indicatif, et en faisant l'hypothèse que la synthèse capsulaire est directement dépendante du glucose, la synthèse capsulaire représente entre 0,3 % et 2 % du glucose consommé. Concernant les acides teichoïques, on constate que leur synthèse est directement corrélée à la croissance, et ce pour l'ensemble des sérotypes. Ce résultat est en accord avec le fait que la synthèse des acides teichoïques possède plusieurs points de convergence avec la synthèse du peptidoglycane (paragraphe II.2.1 de la bibliographie). La lyse cellulaire ne se traduit pas par une chute de leur titre.

II.2.2 Interprétation

L'utilisation de sérotypes présentant des comportements différentiels dans les conditions standards apporte différentes informations. Concernant les connaissances, le comportement homolactique et la capacité de transition vers un métabolisme mixte pour le pneumocoque sont confirmés par ces essais. Ainsi, lors de la perception d'une limitation nutritionnelle, la bactérie est capable de dévier son métabolisme vers des voies pour lesquelles le bilan énergétique est plus favorable (métabolisme mixte produisant 1 ATP supplémentaire). Par ailleurs, l'existence d'une capacité variable à consommer le sucre selon les sérotypes, et ce dans l'environnement contrôlé du fermenteur, est une information importante. En effet, elle suggère que les différentes souches utilisées ont un potentiel métabolique qui leur est propre, suggérant une adaptation au niveau génétique (bien que les gènes du métabolisme central soient généralement très conservés car indispensables), ou encore épigénétique (adaptation n'ayant pas pour origine un changement génétique, comme une mutation). Ce caractère différentiel est confirmé par la variabilité des rendements en biomasse, confirmant que ces sérotypes ont besoin de plus ou moins de sucre pour faire

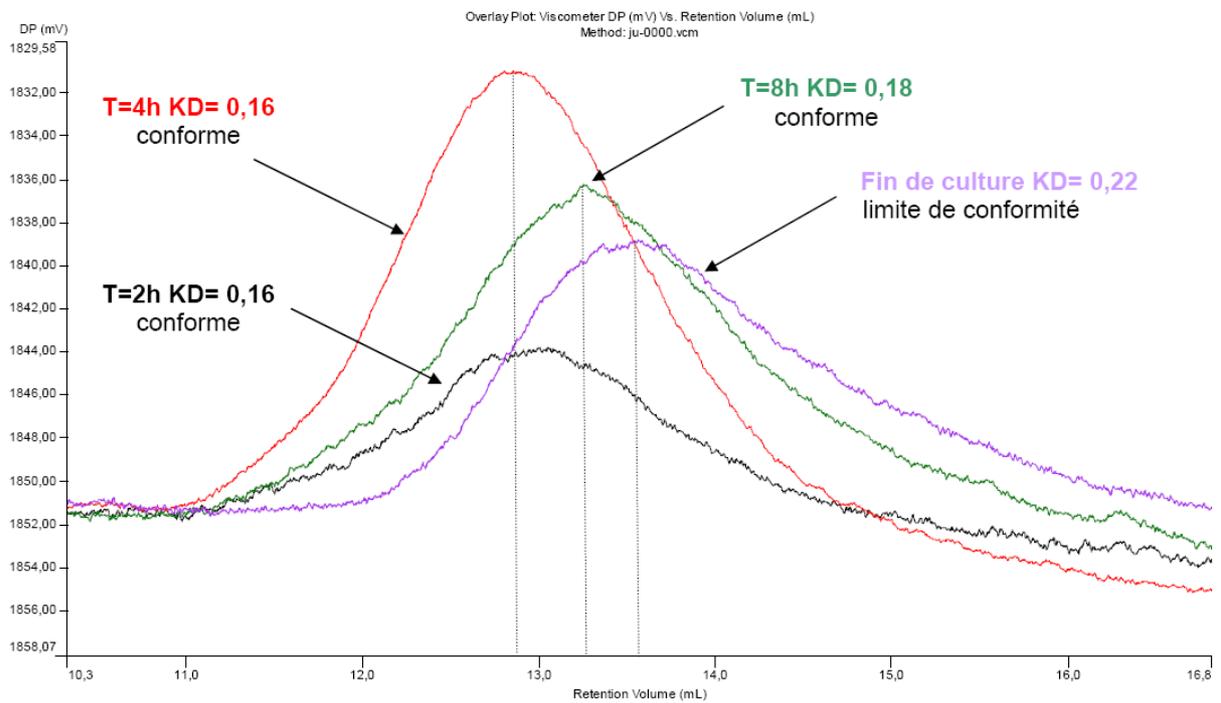


Figure 49. Suivi de la taille du polysaccharide capsulaire par viscosimétrie (HPSEC) lors de la culture du sérotype 33F à l'échelle 5 l en conditions standards.

leur croissance. Cette observation pose la question de l'origine de ces différences, probablement multifactorielle, et donc liée à l'histoire de ces souches depuis leur isolement initial.

Dans l'optique de résolution de la problématique industrielle, des pistes sérieuses peuvent découler des différentes observations sur ces cultures. Concernant les problèmes de rendement, il apparaît clairement que le sérotype 5, sérotype ayant la plus faible productivité, présente un comportement atypique vis-à-vis des autres. Tout d'abord, il est le seul pour lequel le quasi arrêt de la croissance n'est pas corrélé à l'épuisement du glucose, suggérant à l'évidence la présence d'une autre limitation nutritionnelle. Cette suggestion est renforcée par le fait que ce sérotype présente le taux de croissance le plus faible, et est le seul à dévier plus de 25 % du glucose disponible vers la production de métabolites secondaires. Leur production étant induite par des phénomènes de carence, cette observation suggère que le sérotype 5 perçoit une limitation de façon plus marquée que les autres. Par ailleurs, il est le seul à présenter un phénotype en chaînettes suggérant un stress particulier. Enfin, sa production capsulaire semble s'effectuer « au mauvais moment », à savoir lorsque l'activité métabolique ralentit fortement. Pour les autres sérotypes, l'arrêt de croissance semble directement lié à l'épuisement du glucose, bien que cela reste à confirmer. On remarque aussi que les différents sérotypes se mettent à lyser spontanément lors de l'épuisement du glucose, se traduisant par une chute progressive du titre en polysaccharide capsulaire. La seule exception est encore une fois le sérotype 5 qui par le maintien d'une activité métabolique lors de la phase de post-acidification lyse relativement peu, son titre en capsule restant stable. Même si aucune activité de dégradation du polysaccharide capsulaire n'a clairement été identifiée chez le pneumocoque, le fait qu'elle coïncide avec la lyse cellulaire est une observation intéressante. En effet, il est plausible que la lyse naturelle provoque la libération du matériel cellulaire et son contenu enzymatique, entraînant ainsi la dégradation progressive de la capsule et la chute du titre. Toutefois, on ne peut écarter une seconde hypothèse qui serait l'induction d'une activité de dégradation lors de l'atteinte de la phase stationnaire.

Concernant la problématique de taille du polysaccharide capsulaire, un suivi a été réalisé sur le sérotype 33F par HPSEC (figure 49). Au cours de la culture, on peut observer l'augmentation progressive du coefficient de partition KD, coefficient inversement proportionnel à la taille du CPS. Ainsi, la lyse cellulaire et la chute du titre en capsule se traduisent clairement par une diminution de la taille du polysaccharide capsulaire. Dans le cas de cet essai, la taille finale s'est révélée proche de la limite de conformité, en accord avec ce

que l'on peut observer en production pour ce sérotype. Je tiens à noter qu'une des stratégies adoptées par Sanofi-Pasteur sur d'autres sérotypes présentant des problèmes de taille (9V et 11A) a été d'arrêter temporairement les cultures plus tôt qu'habituellement, au moment où le KD était encore conforme. Pour autant, il ne s'agissait que d'une solution ponctuelle pour assurer la production du vaccin Pneumo 23, qui n'était pas envisageable à long terme.

II.2.3 Conclusion

Ces essais avaient pour principaux objectifs de vérifier la validité du modèle mis en place, de réaliser un échantillonnage pour la partie fondamentale de la thèse, et enfin d'avoir une idée de la variabilité des différents sérotypes dans l'optique d'une amélioration. Concernant la validité du modèle, celui-ci s'est avéré tout à fait représentatif de ce qui peut se passer en production, notamment en termes de différence de productivité capsulaire. En comparaison avec les standards de production (figure 26), le sérotype 5 reste le plus faible producteur, les sérotypes 4, 8 et 20 ont des niveaux de productivité équivalents, et le sérotype 33F a la productivité la plus élevée.

Concernant des améliorations potentielles, les principales pistes sont l'existence d'une limitation nutritionnelle particulière pour le sérotype 5, un arrêt de croissance qui semble lié à l'épuisement du glucose pour les autres sérotypes, et un phénomène de lyse naturelle qui suggère la chute du titre et la perte de qualité du polysaccharide capsulaire. A partir de ces observations, une partie de mon travail a consisté à identifier les facteurs sur lesquels il était possible d'agir pour améliorer le procédé, tout en gardant à l'esprit un certain nombre de contraintes réglementaires liées à la production de vaccins.

II.3 Amélioration de la productivité capsulaire : ajustement des paramètres nutritionnels

II.3.1 Les contraintes réglementaires

Réaliser des modifications susceptibles d'améliorer un procédé industriel implique une réflexion sur le cadre réglementaire dans lequel sont réalisées les productions vaccinales (et les médicaments en général). En effet, la production du vaccin Pneumo 23, tout comme les autres types de vaccins, est soumise à une autorisation de mise sur le marché (AMM), dans laquelle les différents paramètres de pilotage du procédé sont précisés. Toute modification du dossier d'AMM doit faire l'objet d'un dépôt de variation par le service des affaires réglementaires de Sanofi-Pasteur, auprès des autorités de santé. Ainsi, il est relativement difficile de mettre en place une modification importante si celle-ci doit remettre en cause l'AMM, puisqu'un changement majeur dans le dossier peut impliquer dans certains cas la nécessité d'essais cliniques (coûteux et longs). Il était donc nécessaire que ma réflexion autour des améliorations potentielles prenne en compte ce paramètre, afin d'éviter de proposer des solutions inapplicables.

II.3.2 Les cibles d'amélioration

Le contexte réglementaire mis en place, la question était de savoir sur quels paramètres il était possible d'agir. A la vue des différents résultats obtenus depuis le début de cet exposé, l'ajustement des composés déjà présents dans le milieu semble être la piste la plus prometteuse. Quelque soit la solution envisagée, l'idée a été de trouver une solution applicable si possible à l'ensemble des sérotypes.

Deux axes d'améliorations ont été explorés. Tout d'abord, ma réflexion s'est tournée vers l'amélioration de la productivité spécifique en polysaccharide capsulaire. Cette idée a été rapidement abandonnée car elle impliquait une modification de la source carbonée, ce qui au point de vue réglementaire était trop contraignant. Des essais préliminaires ont cependant montré que l'utilisation de saccharose à la place du glucose améliorait la productivité spécifique capsulaire. En effet, pour une biomasse maximale passant de 1,5 g/l à 1,7 g/l, le titre maximal en capsule atteint 0,31 g/l (au lieu de 0,17 g/l) soit un gain de productivité capsulaire d'un facteur 1,7.

Comme présenté dans la partie fondamentale des résultats, la synthèse capsulaire est directement corrélée à l'accumulation du FDP, accumulation plus importante en présence de saccharose vis-à-vis du glucose. Toutefois, cette modification ne réglait pas le problème de lyse cellulaire présent chez certains sérotypes.

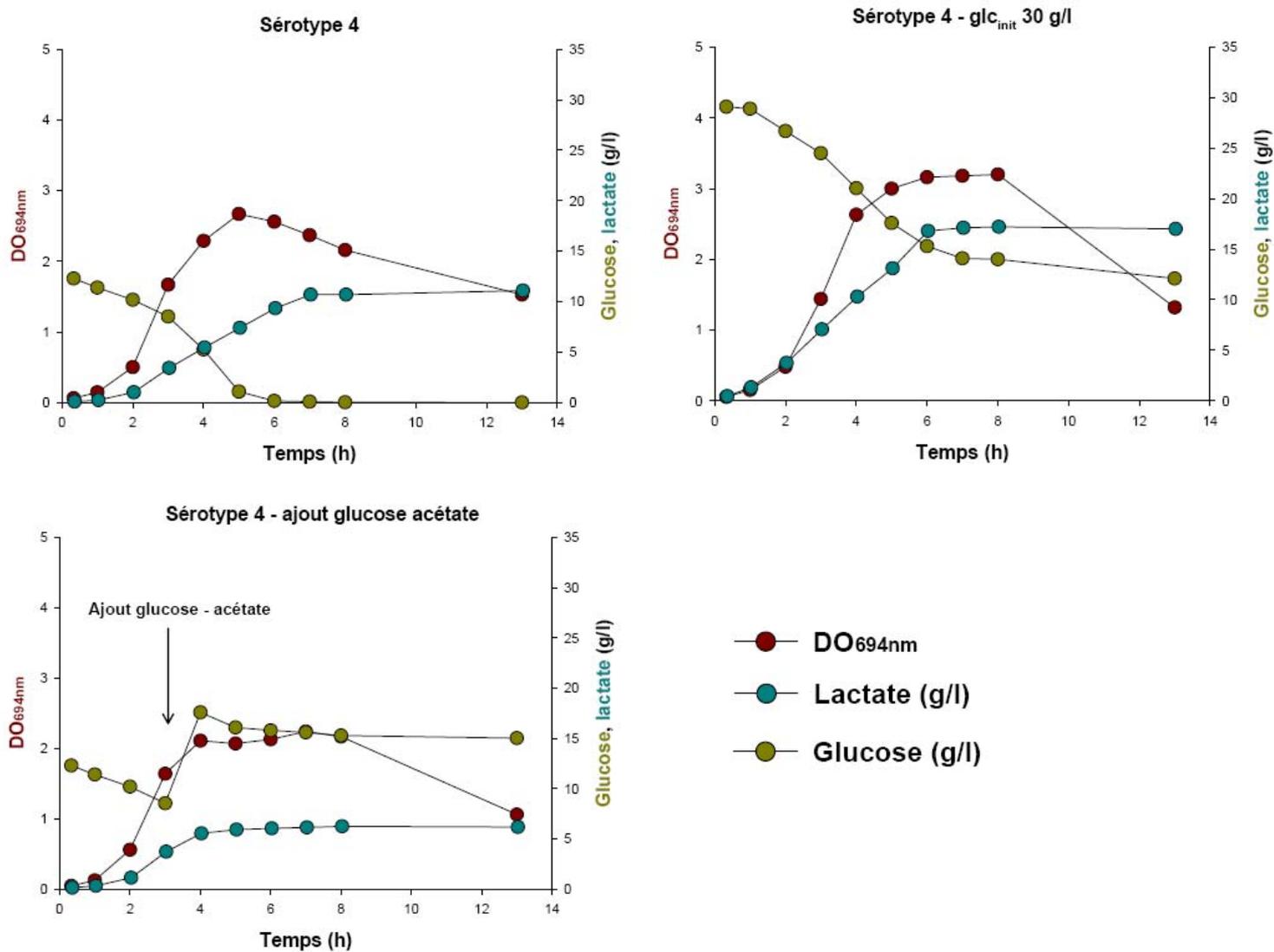


Figure 50. Cultures à l'échelle 5 l dans les conditions standards pour le sérotype 4, avec supplémentation en glucose initial (30 g/l), ou ajout de solution de glucose-acétate.

Le deuxième axe d'amélioration a consisté à tirer profit des 13 heures disponibles sur le procédé industriel pour faire plus de biomasse et en conséquence probablement plus de capsule, et ainsi de limiter la phase pendant laquelle le polysaccharide se dégrade (en prolongeant la phase de croissance). Cette solution répondrait potentiellement aux deux problématiques à la fois, à savoir le rendement et la taille. Je vais détailler dans les paragraphes qui suivent les modifications apportées dans ce cadre.

II.3.3 Augmentation de la concentration en glucose

Sur les cinq sérotypes étudiés, quatre d'entre eux présentent un arrêt de croissance qui semble corrélé à l'épuisement du glucose dans le milieu. Toutefois, l'ajout de glucose-acétate à 6 h de culture dans le procédé standard ne provoque pas de redémarrage de la croissance. On peut donc se demander si cet ajout n'est pas effectué trop tardivement dans la culture, et s'il ne serait pas plus favorable de l'ajouter pendant la phase exponentielle de croissance. Dans l'optique d'amélioration de la croissance, j'ai décidé dans un premier temps de tester sur le sérotype de référence (sérotype 4) deux types d'augmentation de la quantité de glucose : d'une part, d'ajouter le glucose-acétate pendant la phase exponentielle de croissance, et d'autre part de démarrer la culture avec une concentration initiale en glucose de 30 g/l (au lieu de 12,6 g/l). Le glucose étant déjà présent dans le milieu de culture, il n'est pas contraignant d'ajuster sa concentration en termes d'aspects réglementaires. Le résultat des profils obtenus pour ces deux types de modifications est présenté en figure 50.

Concernant tout d'abord l'essai avec une concentration en glucose initial de 30 g/l (figure 50), on constate qu'il n'y a pas d'augmentation significative de la biomasse du sérotype 4, vis-à-vis des conditions standards. En effet, la DO maximale obtenue lors de cet essai est seulement de 3,2 contre 2,7, ne constituant pas en soi une amélioration réelle. De plus, on peut facilement voir sur la figure 50 que le glucose disponible n'est pas totalement consommé, puisqu'il reste environ 13 g/l de glucose résiduel en fin de culture. Le surplus de consommation vis-à-vis des conditions standards (environ 4,5 g/l de glucose consommé en plus) permet un maintien de l'activité métabolique des cellules, qui par conséquent produisent plus d'acide lactique et lysent plus tardivement (à partir de 8 h de culture au lieu de 5 h). Cela confirme que le maintien de l'activité métabolique pourrait potentiellement

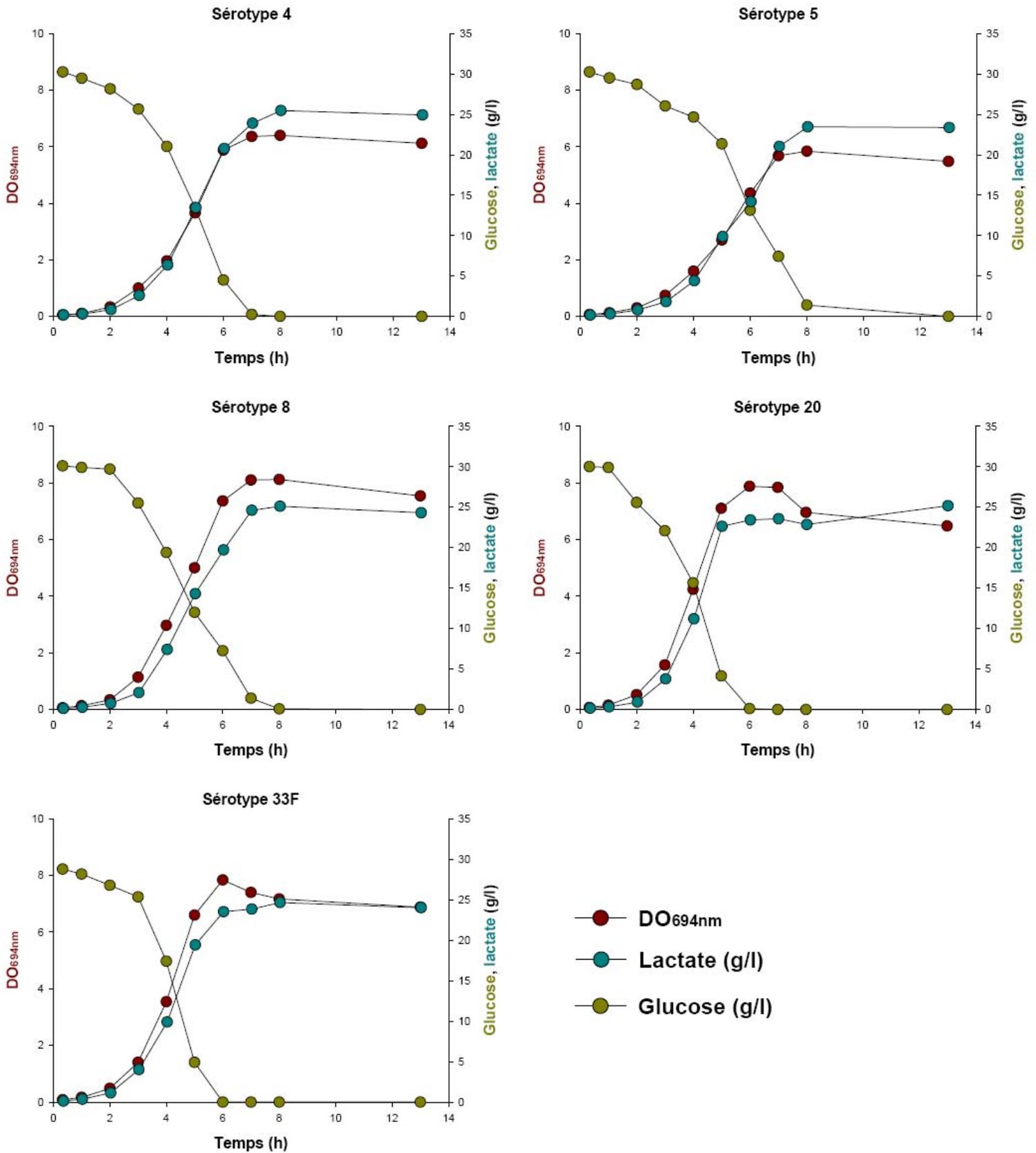


Figure 51. Cultures à l'échelle 5 l dans les conditions choline + pour les sérotype 4, 5, 8, 20 et 33F. Suivi macrocinétique de la croissance, du glucose et du lactate.

résoudre la problématique de qualité de produit, mais cela ne s'est pas traduit dans ces conditions par une plus forte biomasse. Concernant la production de polysaccharide capsulaire, elle reste pour sa part équivalente aux conditions standards, puisque le titre maximal atteint est de 0,165 g/l dans ces conditions (contre 0,17 g/l en conditions standards). Toutefois, l'information essentielle est que le glucose n'est pas la limitation nutritionnelle présumée pour la croissance dans ces conditions. Cette information est très probablement extrapolable aux autres sérotypes qui présentaient aussi cette limitation.

L'essai réalisé avec un ajout de glucose-acétate en phase exponentielle de croissance ne s'est pas non plus révélé concluant. Comme présenté en figure 50, son ajout provoque un arrêt quasi-immédiat de la croissance, le DO maximale étant seulement de 2,2. De plus, le blocage de la production d'acide lactique suggère un arrêt complet du métabolisme que j'attribue au rôle probablement inhibiteur de l'acétate. En effet, sa concentration est extrêmement élevée dans cette solution (117 g/l), pour donner dans le fermenteur une concentration d'environ 4 g/l probablement toxique pour les cellules. De plus, l'ajout de cette solution se traduit par une variation d'une unité pH environ, rattrapée assez rapidement par la régulation mais là encore certainement néfaste. Ainsi, le titre maximal en capsule dans ces conditions n'atteint que 0,13 g/l.

Au final, même si le glucose est un levier nécessaire à la croissance notamment pour son aspect énergétique, il n'est pas suffisant pour l'améliorer significativement dans les conditions standards, et donc améliorer la productivité capsulaire.

II.3.4 Augmentation de la concentration en choline parallèlement à la concentration en glucose

Les résultats précédents viennent de confirmer que la limitation nutritionnelle présumée pour quatre des cinq sérotypes n'est pas uniquement due au glucose, et ce dans les conditions industrielles. Par ailleurs, le fait que le sérotype 5 perçoive une autre limitation nutritionnelle suggère qu'elle existe en réalité pour les autres sérotypes, bien que le sérotype 5 semble plus rapidement carencé. La partie fondamentale de cet exposé, couplée au travail bibliographique et à l'analyse approfondie de la composition du milieu de culture, m'a amené à identifier la choline comme un candidat à cette limitation. En effet, le sérotype 5 est le seul pour lequel on observe un phénotype chaîné au cours de la culture, or la choline est

Table 22. Principales données macrocinétiques pour les essais à l'échelle 5 l en conditions choline⁺. Taux de croissance (μ), vitesse spécifique de consommation du glucose (q_s) et rendement en biomasse (R_{X_S}).

Sérotype	4	5	8	20	33F
μ^a (h ⁻¹)	1,1±0,04	0,9±0,05	1,2±0,07	1,2±0,02	1,05±0,08
Titre en biomasse maximal (g/l de masse sèche)	3,5 ± 0,08	3,5 ± 0,09	4,45 ± 0,10	4,35 ± 0,02	4,3 ± 0,12
DOmax	6,4 ± 0,2	5,9 ± 0,1	8,1 ± 0,3	7,9±0,2	7,8 ± 0,1
q_s^b (mmol.g ⁻¹ .h ⁻¹)	36,1 ± 0,5	25,3 ± 0,3	37,2 ± 0,8	39,2 ± 0,6	35,6 ± 1,1
$R_{X_S}^c$ (g.mol ⁻¹ glc)	30,5 ± 1,8	35,6 ± 1,2	32,5 ± 0,9	30,6 ± 0,9	29,9 ± 0,5
Titre max en capsule (g/l)	0,45 ± 0,02	0,1 ± 0,03	0,5 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,7 ± 0,02
Gain de productivité capsulaire ^e	2,6	2,5	2,3	1,8	2,9
Glc résiduel quand $\mu \neq 0$ (g/l)	0,2 ± 0,03	1,4 ± 0,2	0,1 ± 0,02	0,1 ± 0,02	0
Part du glucose en lactate (%)	85,2 ± 0,9	83,9 ± 1,1	83,8 ± 1,3	84,2 ± 0,6	85,3 ± 2,4
Part du glucose en formiate (%)	6,1 ± 0,4	5,8 ± 0,5	6,8 ± 0,8	6,9 ± 0,3	7,3 ± 0,3
Part du glucose en acétate (%)	2,3 ± 0,4	1,9 ± 0,2	3,4 ± 0,6	3,3 ± 0,5	3,2 ± 0,2
Part du glucose en éthanol (%)	2,1 ± 0,1	1,3 ± 0,4	2,9 ± 0,2	2,8 ± 0,4	3,1 ± 0,2
Bouclage bilan carbone*** (%)	95,1 ± 1,2	93 ± 1,1	97 ± 2,1	97 ± 2,4	98 ± 0,6

^a, ^b, ^c et ^d: cf. table 21.

^e: ratio du titre maximal en capsule en condition choline⁺ et en conditions standards.

indirectement impliquée dans la séparation des cellules via l'activité des choline binding protein (paragraphe III.3 de la Bibliographie). Par ailleurs, la comparaison des niveaux d'expression de l'opéron *lic2* en phase exponentielle de croissance a révélé une induction en faveur du sérotype 5. Etant donné que *lic2* a été identifié comme induit par la carence en choline, il s'agit là encore d'un argument supplémentaire. Enfin, l'analyse du milieu de culture utilisé chez Sanofi-Pasteur indique une concentration en choline de l'ordre de 0,01 g/l, soit 50 fois moins que la concentration minimale requise pour avoir une croissance non limitante (Yother *et al.*, 1998).

La prise en compte des ces différents paramètres m'a conduit à réaliser, toujours dans le même modèle d'étude, un ajustement de la concentration en glucose (toujours à 30 g/l) mais cette fois-ci en modifiant en parallèle la concentration en choline à 5 g/l, afin d'évaluer un effet ou non. Il faut noter que la choline est déjà présente dans le milieu de culture, cette solution ne représentant donc pas une barrière au niveau réglementaire. De plus, le coût de la choline reste raisonnable (environ 150 euros les 5 kg), et ne constitue pas un frein à l'évaluation d'un effet potentiel. Enfin, l'exigence nutritionnelle en choline est propre à l'ensemble de sérotypes, et donc si amélioration il y a, elle pourrait être applicable aux 23 sérotypes du vaccin.

II.3.4.1 Analyse macrocinétique

Par soucis de simplicité, l'ajustement de la concentration en glucose à 30 g/l et de la choline à 5 g/l sera nommé choline+.

✓ Croissance et métabolisme

La figure 51 présente les profils obtenus lors de la culture en fermenteur 5 l pour les cinq sérotypes étudiés. Les principales données macrocinétiques concernant ces cultures sont présentées en table 22. Pour l'ensemble des sérotypes, l'ajustement en parallèle du glucose et de la choline se traduit par une augmentation de la phase exponentielle de croissance d'environ 1 h, avec maintien d'un taux de croissance compris entre 0,95 h⁻¹ et 1,2 h⁻¹, soit des valeurs proches de celles obtenues dans les conditions standards. Cet allongement de la phase de croissance aboutit à une augmentation significative de la quantité de biomasse, qui est

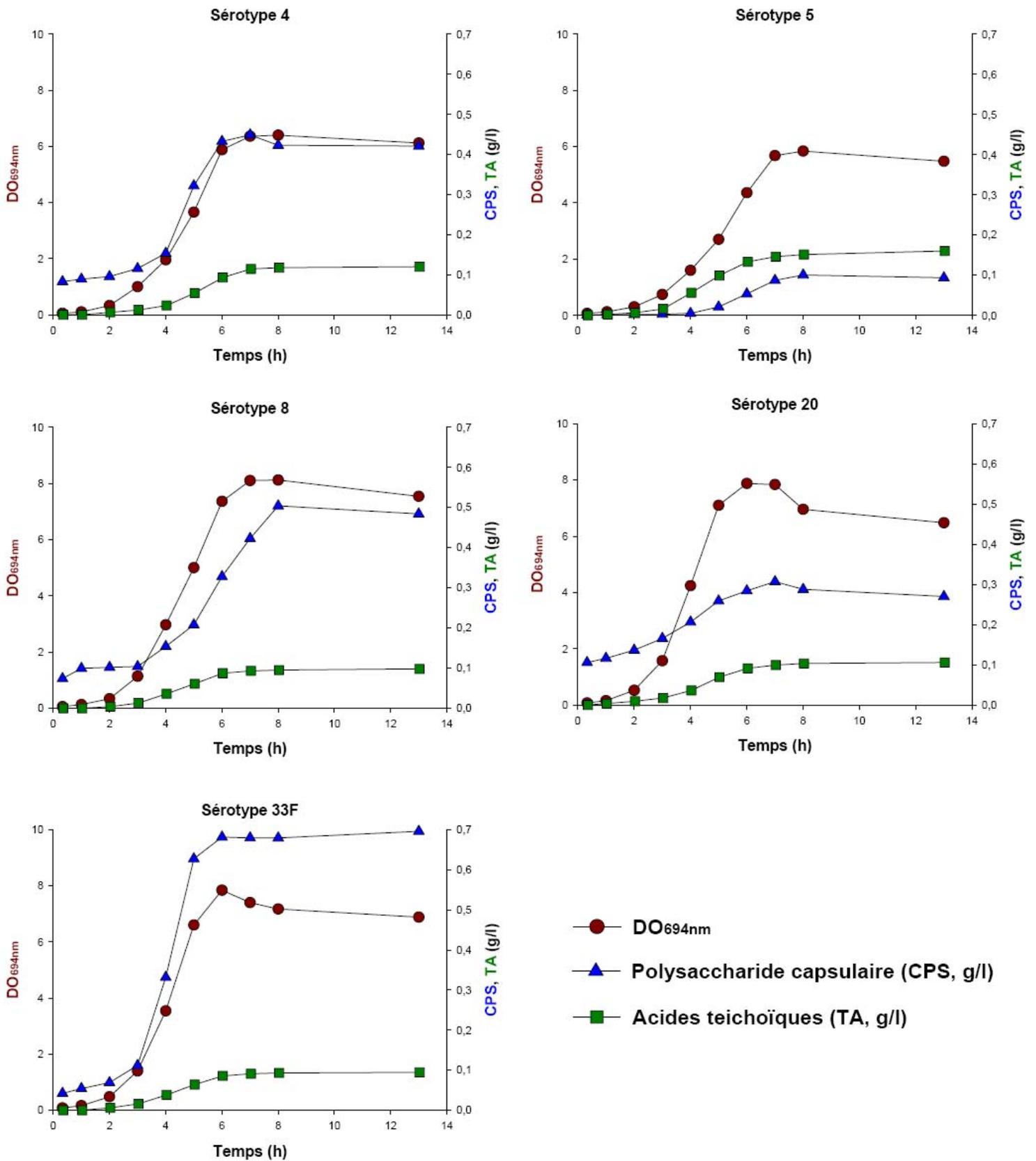


Figure 52. Cultures à l'échelle 5 l dans les conditions choline+ pour les sérotype 4, 5, 8, 20 et 33F. Suivi macrocinétique de la croissance, du polysaccharide capsulaire et des acides teichoïques.

au minimum doublée pour l'ensemble des sérotypes testés. Concernant la morphologie des cellules, on retrouve pour tous les sérotypes un phénotype classique de type diplocoque, le sérotype 5 présentant quelques chaînettes de façon résiduelle.

Pour les sérotypes 4, 8, 20 et 33F, l'arrêt de croissance est corrélé à l'épuisement du glucose dans le milieu de culture. Quant au sérotype 5, la concentration résiduelle en glucose lors de la chute du taux de croissance est de 1,4 g/l, soit une réduction de plus de 60 % vis-à-vis des conditions standards. Dans tous les cas, l'arrêt de croissance se traduit par une lyse cellulaire beaucoup moins marquée que celle observée précédemment. L'analyse des vitesses spécifiques montre une augmentation significative de celles-ci pour l'ensemble des sérotypes en comparaison avec les conditions standards. Les taux de croissance restant relativement équivalents, les rendements en biomasse dans les conditions choline+ diminuent de façon importante, signifiant que les cellules utilisent spécifiquement beaucoup plus de sucre pour faire leur croissance. Concernant l'aspect métabolique, le caractère homolactique est maintenu dans ces conditions pour l'ensemble des sérotypes, avec une production majeure d'acide lactique pendant la phase exponentielle de croissance. Pour les sérotypes 4, 8, 20 et 33F, la quantité de glucose utilisée pour synthétiser l'acide lactique est légèrement augmentée vis-à-vis des conditions standards, la quantité déviée vers le métabolisme mixte étant diminuée. Pour le sérotype 5, l'importante déviation vers le métabolisme mixte observée en conditions standards n'est plus visible en condition choline+, le bilan carbone retrouvant une distribution similaire à celle des autres sérotypes avec une production en acide lactique équivalente (autour de 25 g/l). En effet, la part du glucose allant vers les sous produits fermentaires n'est plus que de 9 % contre les 25 % observés en conditions standards. Bien qu'il existe une concentration résiduelle en glucose de 1,4 g/l lors de la chute du taux de croissance, on ne peut plus parler de phase de post-acidification puisque la production d'acide lactique s'arrête lors de l'arrêt de croissance.

✓ Polysaccharide capsulaire et acides teichoïques

De la même manière que dans les conditions standards, la production de polysaccharide capsulaire s'effectue à nouveau pendant la phase exponentielle de croissance (figure 52). Pour l'ensemble des sérotypes, l'augmentation de la productivité en biomasse se traduit par une augmentation parallèle de la productivité capsulaire. Plus précisément, le gain de productivité dans ces conditions est compris entre 1,8 pour le sérotype 20 et 2,9

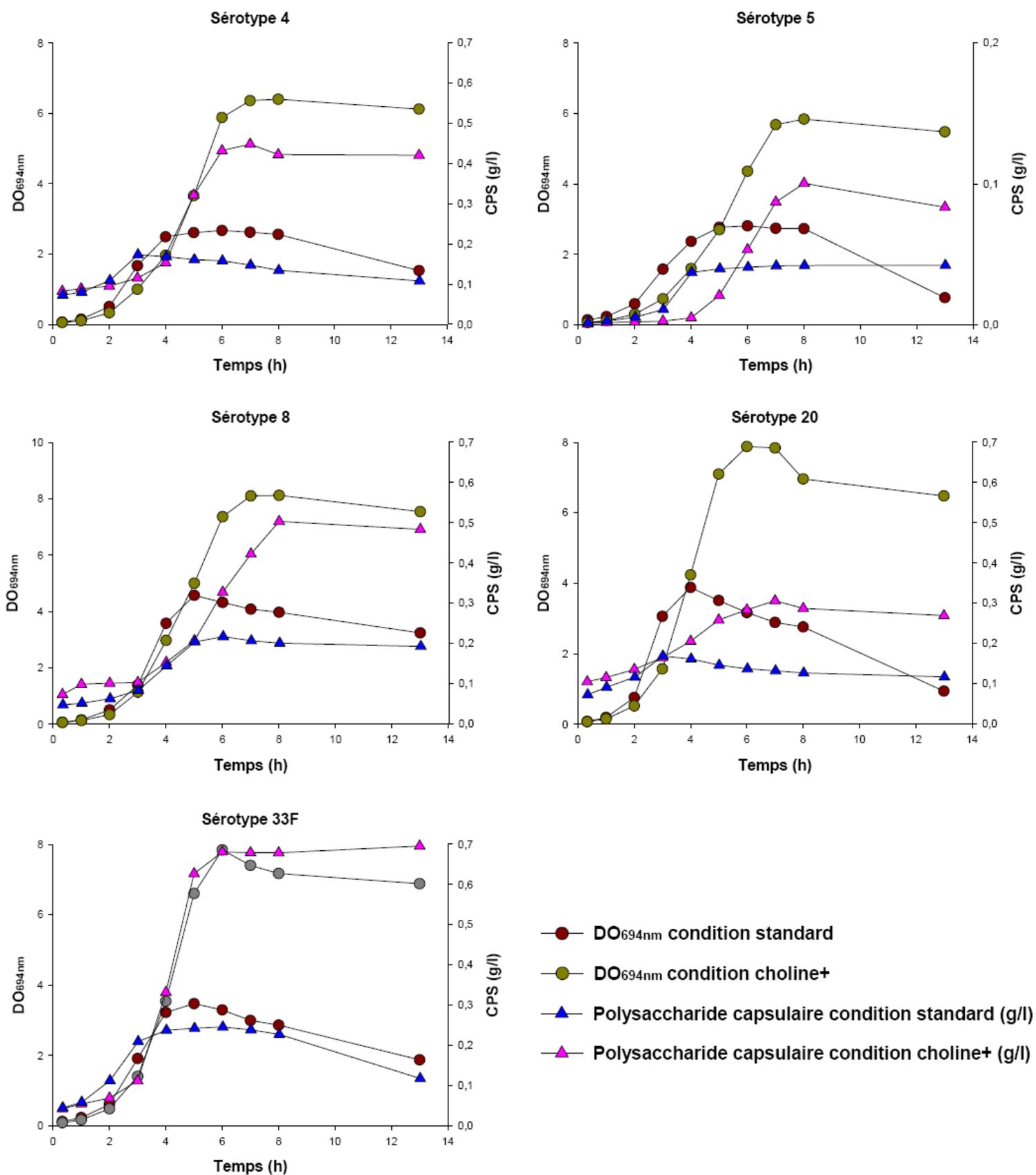


Figure 53. Comparaison de croissance et de productivité capsulaire entre la condition standard et la condition choline+ lors des essais de culture à l'échelle 5 l.

pour le sérotype 33F, si on se réfère au titre maximal en polysaccharide capsulaire obtenu (figure 53 et table 22). La part du glucose utilisée pour la production capsulaire est équivalente à celle observée en conditions standards, à savoir entre 0,3 % et 2,3 %. Par ailleurs, la chute particulièrement importante du titre en capsule observée précédemment est ici très nettement atténuée, en absence d'une forte lyse cellulaire.

Concernant les acides teichoïques, on constate une fois de plus que leur synthèse est directement corrélée à la croissance, leur titre étant en moyenne deux fois plus élevé. Ainsi, la supplémentation en choline (qui s'incorpore dans les acides teichoïques) ne se traduit pas par une augmentation spécifique de leur synthèse. C'est un résultat positif dans la mesure où ils constituent des contaminants à éliminer lors de la purification.

II.3.4.2 Interprétation

Les gains de productivité en biomasse obtenus pour l'ensemble des sérotypes confirment que le paramètre nutritionnel limitant de la croissance, dans les conditions standards, est bel et bien la choline. Ceci est confirmé par la « récupération » d'une morphologie et d'un métabolisme standard de la part du sérotype 5, conjugué à un léger renforcement du caractère homolactique des autres sérotypes. Le fait de supplémenter le milieu de culture avec de la choline, tout en assurant une disponibilité en glucose suffisante, permet au pneumocoque de maintenir sa phase exponentielle de croissance pendant environ 1 h de plus. L'atteinte de la phase stationnaire est ainsi comprise entre 6 h et 8 h de culture, soit en moyenne 2 h de plus qu'en conditions standards. Comme prévu et présenté en figure 53, cette augmentation de productivité en biomasse se traduit par une forte augmentation de la productivité capsulaire, les titres étant au minimum doublés pour le sérotype 20, voire triplés pour le sérotype 33F. Ainsi, un meilleur maintien de l'activité métabolique assure une productivité capsulaire accrue, se conservant pendant toute la phase de croissance. Dans la majorité des cas, on peut parler d'augmentation de la productivité spécifique en capsule, vis-à-vis de la biomasse obtenue. Toutefois, le différentiel de productivité capsulaire est maintenu, le sérotype 5 restant le moins productif. Concernant la taille du polysaccharide capsulaire, le maintien de la croissance conjugué à une lyse très atténuée se traduit par une conformité du produit en fin de culture, et ce pour tous les sérotypes.

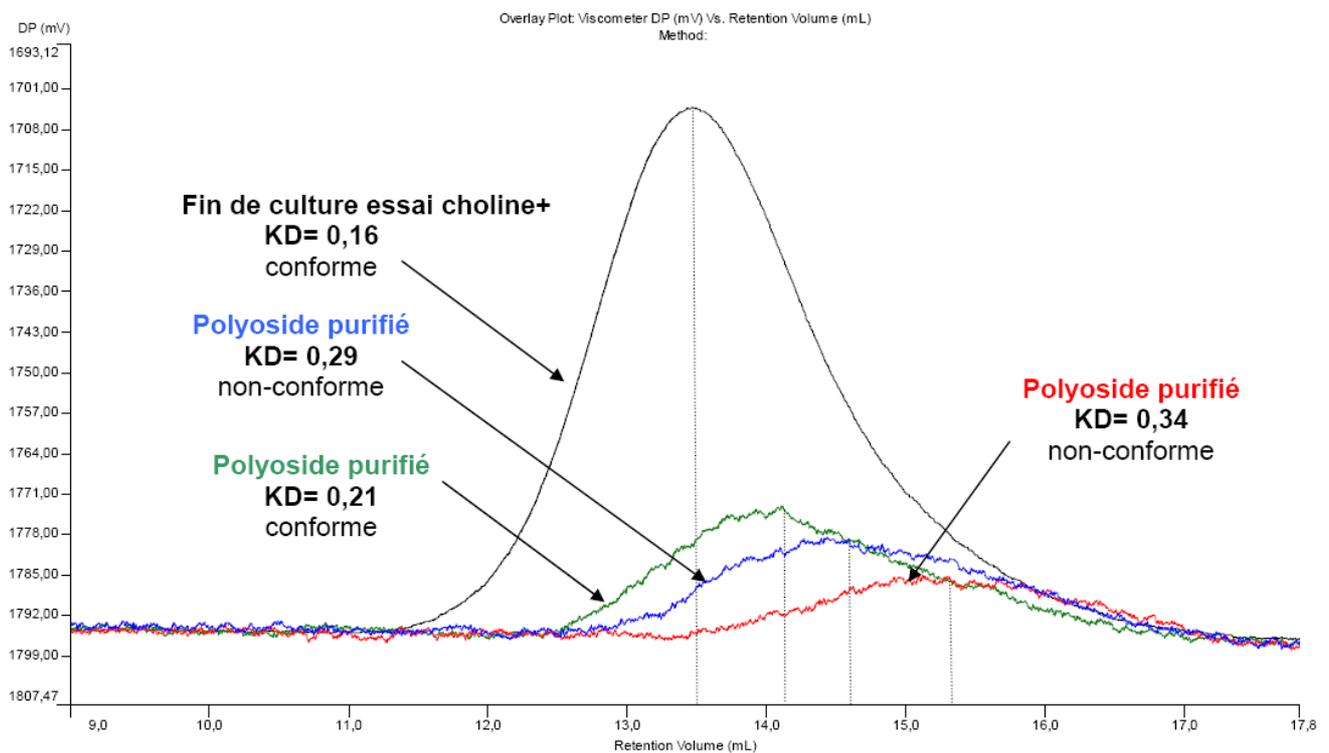


Figure 54. Suivi de la taille du polysaccharide capsulaire par viscosimétrie (HPSEC) lors de la culture du sérotype 33F à l'échelle 5 l en conditions choline+. Comparaison effectuée avec 3 lots de polyosides purifiés de sérotype 33F conformes ou non conformes. Le décalage observé entre les temps de sortie de cette figure et ceux obtenus en figure 49 est simplement dû à un changement de colonne, décalant aussi les références.

Comme présenté en figure 54, le sérotype 33F (problème de taille) présente un KD conforme en fin de culture, en comparaison avec 3 lots de production du même sérotype (ces polyosides purifiés correspondent aux poudres obtenues en fin de procédé de purification pour 33F, resuspendues dans de l'eau physiologique à 0,05 g/l). Plusieurs raisons peuvent être à l'origine de l'absence d'une forte lyse cellulaire, et donc de l'absence de dégradation de la capsule dans ces conditions. Tout d'abord, le fait de maintenir la croissance et de déplacer l'atteinte de la phase stationnaire entre 2 et 3 h permet de limiter la phase de déclin. Par ailleurs, l'utilisation de concentrations élevées en choline a tendance à provoquer *in vitro* un relargage partiel des choline binding protein dans le milieu, diminuant ainsi leur activité globale (Yother, 1998). Ainsi, les conditions que j'ai mises en place pourraient perturber le fonctionnement de certaines protéines de surface (LytA), et donc limiter la lyse naturelle.

L'atteinte de la phase stationnaire étant directement corrélée à l'épuisement du glucose, il était intéressant de voir jusqu'où il était possible de « pousser » la croissance. J'ai donc placé les sérotypes 4 et 33F dans les mêmes conditions choline+, mais avec une concentration initiale en glucose de 50 g/l. Malheureusement, cette augmentation ne s'est pas traduite par une amélioration significative de la biomasse et du titre en capsule, même si l'atteinte du plateau est plus progressive dans ces conditions (données non présentées). On peut probablement attribuer ce peu de différence à l'effet toxique de l'acide lactique qui atteint des titres proche de 30 g/l dans ces conditions. Ainsi, le pneumocoque, bien qu'appartenant sans ambiguïté à la famille des bactéries lactiques, est certainement moins tolérant à l'acide lactique qu'une bactérie comme *L. lactis*.

II.3.4.3 Conclusion

L'ajustement des paramètres choline et glucose (en parallèle) semble être une solution très prometteuse sur un plan industriel. Au-delà du gain significatif en termes de productivité capsulaire pour l'ensemble des sérotypes, cette supplémentation permet un meilleur maintien de la phase de croissance, et évite la dégradation du produit consécutive à une phase de déclin trop importante.

Ces essais ont cependant montré les limites d'une culture batch, puisque la supplémentation en glucose à 50 g/l ne permet pas de poursuivre la croissance, probablement à cause de la toxicité de l'acide lactique. Par ailleurs, ces changements sont tout à fait

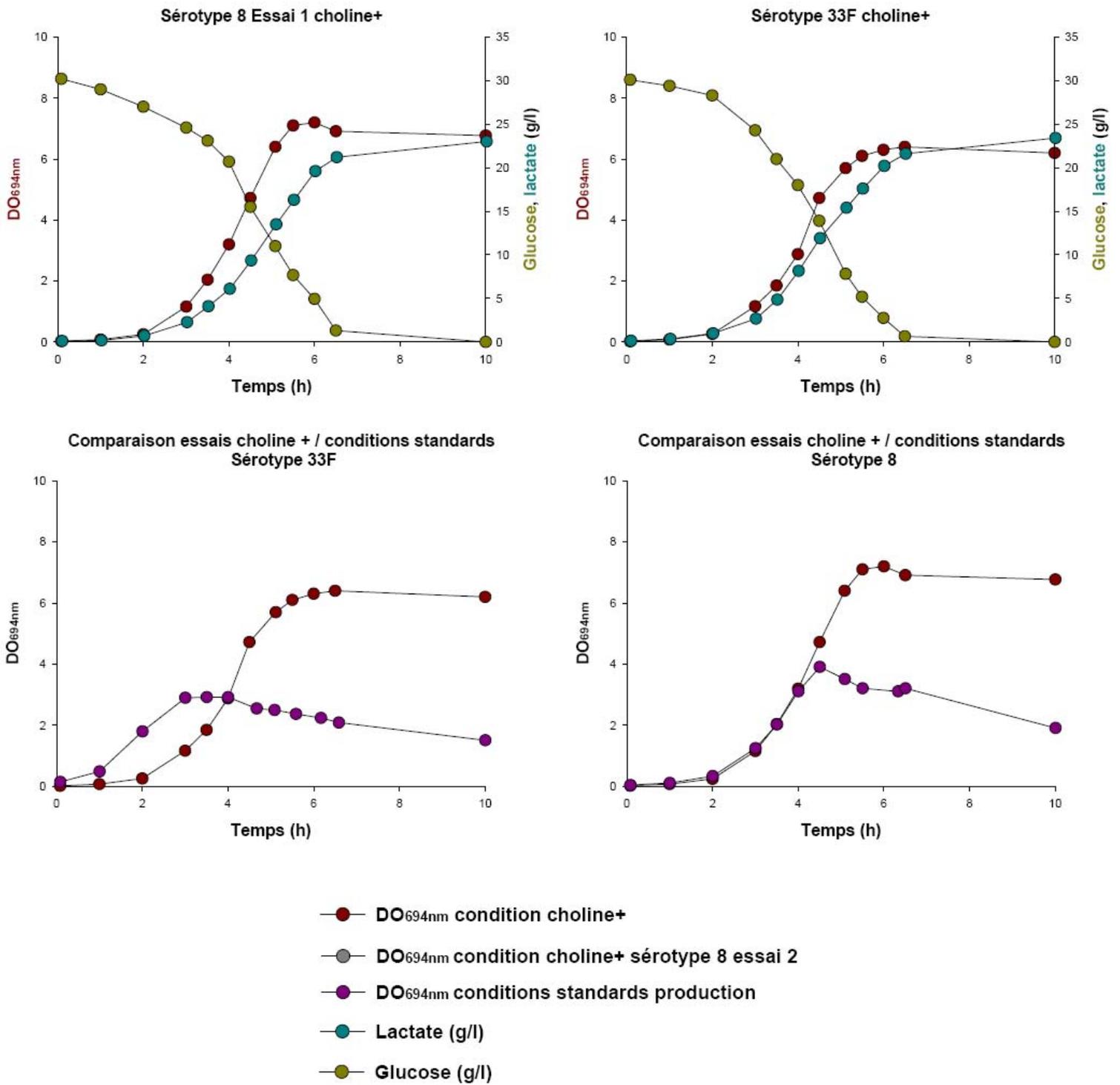


Figure 55. Profils macrocinétiques obtenus lors des essais en production pour les sérotypes 8 et 33F.

envisageables en termes réglementaires. Toutefois, il reste à tester ces nouvelles conditions à l'échelle industrielle afin d'évaluer les potentialités, et les impacts potentiels sur la suite du procédé de production. Concernant un aspect plus fondamental, l'apport en choline a permis de ramener le profil métabolique du sérotype 5 vers un profil plus « standard ». Toutefois, l'amélioration significative du titre en capsule n'empêche pas le maintien du différentiel de productivité entre les différents sérotypes. Enfin, le sérotype 5 présente une sensibilité accrue à la choline vis-à-vis des autres sérotypes, bien que l'origine de celle-ci ne soit pas expliquée. Le séquençage du locus *lic* (impliqué dans l'assimilation de la choline) de cette souche n'a pas révélé de mutations particulières, suggérant probablement des mutations ailleurs sur le chromosome (et donc une nature génétique indirecte).

II.4 Essais à l'échelle industrielle au sein du bâtiment de production

II.4.1 Contexte et mise en place

Suite aux résultats encourageants obtenus dans le modèle d'étude, il a été décidé par l'industriel de savoir si la modification des paramètres nutritionnels choline et glucose était transposable à l'unité de production. J'ai ainsi été amené à conduire des essais directement au sein de cette unité (fermenteur de 2000 l), en collaboration directe avec les équipes de production. Trois essais ont pu ainsi être réalisés, depuis la préculture en flasks jusqu'à la fin de la récolte (cf. Matériel et Méthodes). Deux essais ont été réalisés avec le sérotype 8 (problématique de rendement) afin d'évaluer la reproductibilité, et un essai avec le sérotype 33F (problématique de taille). Les conditions choisies vis-à-vis du procédé standard sont analogues à celles utilisées lors des essais à l'échelle 5 l, soit des concentrations initiales en choline de 5 g/l et en glucose de 30 g/l. Le pH a été régulé à 7,2 tout au long de la culture, sans ajout de glucose-acétate. L'arrêt de la culture a été planifié à 10 h, en accord avec la spécification décrite dans le dossier d'AMM qui est de 13 h \pm 3 h. Enfin, de la même manière qu'à l'échelle 5 l, le passage d'une étape à une autre a été déterminé sur la base de mesures de DO, et non sur des temps de culture. Pour des raisons techniques, un seul essai du sérotype 8 a pu être prélevé pour analyse du glucose et du lactate.

Table 23. Principales données macrocinétiques pour les essais à l'échelle 2000 l en conditions choline+. Taux de croissance (μ), vitesse spécifique de consommation du glucose (q_s) et rendement en biomasse (R_{xS}).

Essais	Sérotype 8 essai 1	Sérotype 8 essai 2	Sérotype 33F
μ^a (h^{-1})	1,25	1,3	1,2
Titre en biomasse maximal (g/l de masse sèche)	3,95	4	3,5
DOmax	7,2	7,3	6,4
q_s^b ($mmol.g^{-1}.h^{-1}$)	40,1	ND*	38,6
R_{xS}^c ($g.mol^{-1} glc$)	31,3	ND	31,1
Titre en capsule (g/l) (fin de culture)	0,46	0,48	0,65
Gain de productivité capsulaire ^e	2,3	2,4	2,7
Glc résiduel quand μ # 0 (g/l)	0,6	ND	1,5
Part du glucose en lactate (%)	75,2	ND	78,4
Part du glucose en formiate (%)	7,1	ND	8,3
Part du glucose en acétate (%)	3,9	ND	3,8
Part du glucose en éthanol (%)	4,1	ND	3,9
Bouclage bilan carbone ^d (%)	90,3	ND	94,4

* : non déterminé

^a, ^b, ^c et ^d: cf. table 21.

^e: ratio du titre maximal en capsule en condition de production choline+ et en conditions standards à l'échelle 5l.

Par ailleurs, le titrage en polysaccharide capsulaire n'a été effectué qu'en fin de culture pour l'ensemble des essais.

II.4.2 Principaux résultats

II.4.2.1 Culture cellulaire

✓ Etapes de préculture

Concernant les étapes de préculture, la seule remarque notable est un temps de latence d'environ trois heures au niveau de la culture en spinner, et ce pour les trois essais réalisés. Rappelons que cette étape constitue la première préculture liquide, après les deux passages en cultures solides. Dans les conditions habituelles, une latence de seulement une heure est présente pour la majorité des sérotypes, latence liée à un fort taux de mortalité en fin de deuxième préculture solide. L'observation microscopique lors de nos essais a révélé de la même manière l'existence d'une lyse très importante. Ainsi, la latence observée ne peut s'expliquer que par les concentrations élevées en glucose et en choline, nécessitant un temps d'adaptation pour le démarrage de la croissance. Ce temps de latence passé, l'atteinte de la phase exponentielle a lieu rapidement ce qui permet l'ensemencement du pré-fermenteur de 120 l. La culture en pré-fermenteur s'est parfaitement déroulée pour les trois essais, avec atteinte d'un taux de croissance maximal compris entre $1,1 \text{ h}^{-1}$ pour le sérotype 8 et $1,2 \text{ h}^{-1}$ pour le sérotype 33F. La DO cible permettant l'ensemencement du fermenteur industriel (DO # 0,3) a été atteinte en 2,5 h en moyenne.

✓ Culture en fermenteur industriel 2000 l

Les profils macrocinétiques obtenus dans le fermenteur industriel de 2000 l sont présentés en figure 55, les principales données étant mentionnées en table 23. Concernant la croissance, on retrouve pour les trois essais des profils équivalents à ceux obtenus en culture 5 l pour la condition choline+. Les taux de croissance, les vitesses de consommation du glucose et les rendements en biomasse restent eux aussi relativement proches, bien que les

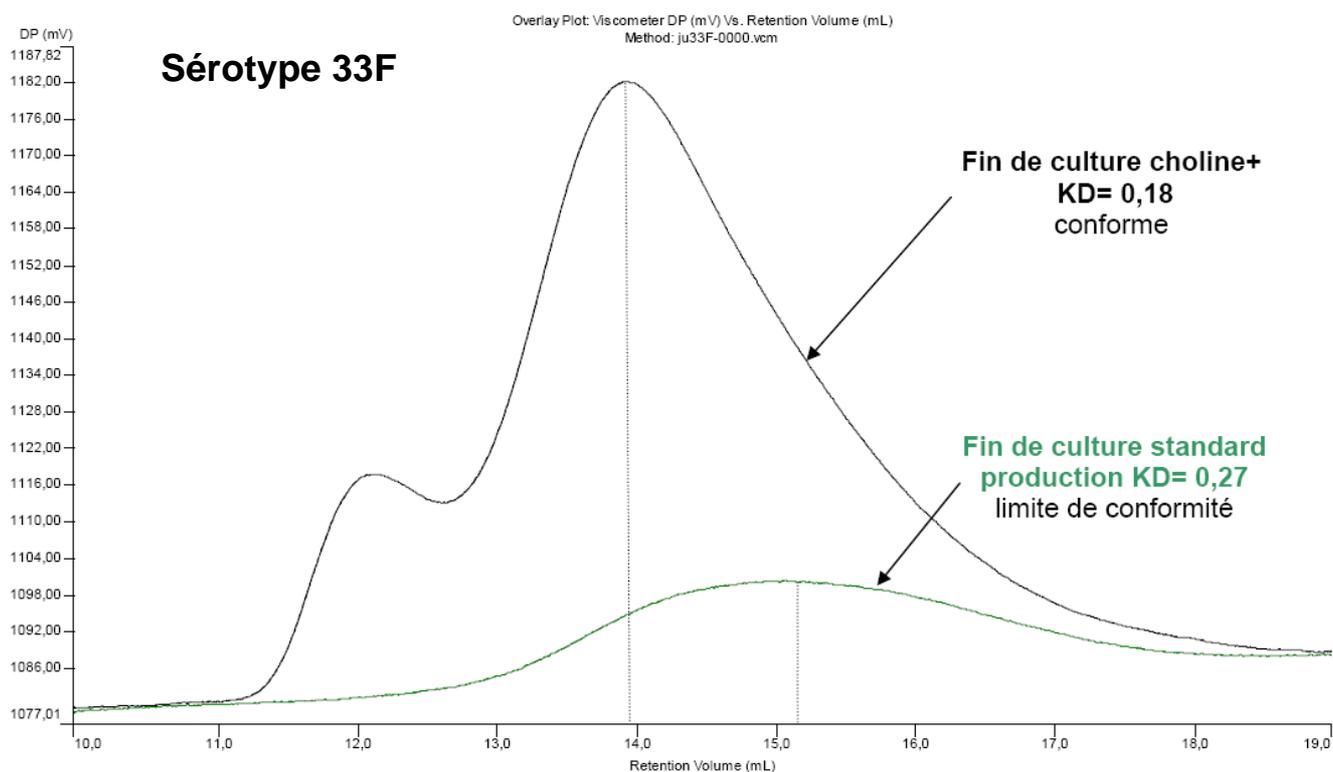
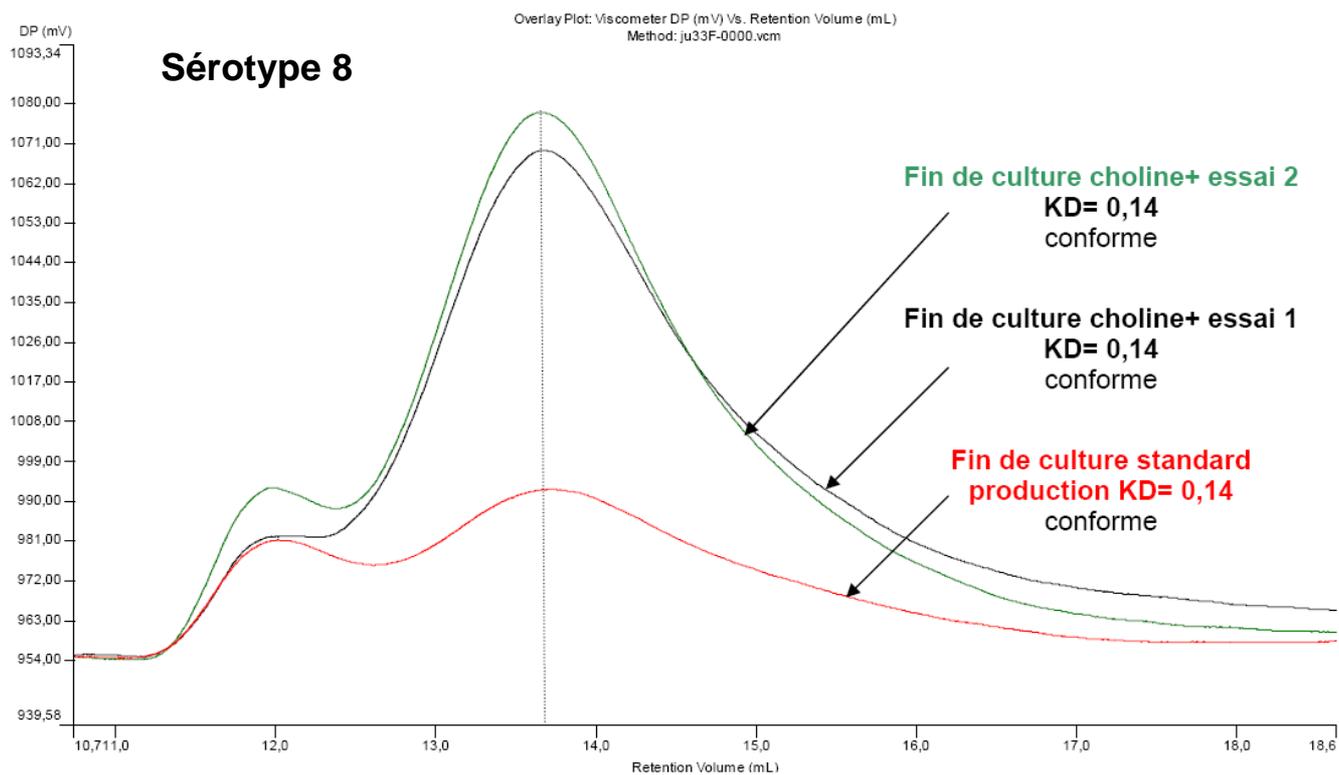


Figure 56. Suivi de la taille du polysaccharide capsulaire par viscosimétrie (HPSEC) lors de la culture des sérotypes 8 et 33F à l'échelle 2000 l en conditions choline+.

titres maxima en biomasse soient légèrement plus faibles que ceux obtenus dans le modèle d'étude. De la même manière, l'arrêt de croissance est directement corrélé à l'épuisement du glucose, et n'est pas suivi d'une lyse importante. Le suivi de la croissance des deux essais réalisés avec le sérotype 8 souligne par ailleurs un haut niveau de reproductibilité (non présenté). La production d'acide lactique est encore une fois majoritaire et a toujours lieu pendant la phase exponentielle de croissance, les bilans carbonés bouclant autour de 90 %. Concernant la distribution de ces bilans, on retrouve pour les trois essais des profils plus proches de ceux obtenus dans les conditions standards à l'échelle 5 l, soit légèrement moins de lactate produit pour un peu plus de sous produits fermentaires. On peut attribuer ce léger différentiel, vis-à-vis des essais à l'échelle 5 l en condition choline+, au fait qu'il est plus difficile de maintenir un environnement parfaitement homogène à cette échelle (notamment au niveau des paramètres physico-chimiques comme le pH ou l'anaérobiose). Ainsi, le pneumocoque doit être globalement « plus stressé » dans cet environnement qu'à l'échelle 5 l. En conséquence, le gain de productivité en biomasse est légèrement plus faible, tout en restant très satisfaisant.

Concernant la productivité capsulaire, les titres maxima sont proches de ceux obtenus en culture 5 l pour la condition choline+, en lien direct avec la productivité en biomasse. Les gains de productivité calculés par rapport aux valeurs standards à l'échelle 5 l sont de 2,3 et 2,4 pour les deux essais concernant le sérotype 8, et de 2,7 pour le sérotype 33F. L'analyse de la taille du polysaccharide capsulaire en fin de culture pour ces différents essais est présentée en figure 56. Cette analyse a été effectuée en parallèle avec des échantillons de fin de culture en production dans des conditions standards. Pour le sérotype 8, les deux essais en conditions choline+ confirment qu'il n'y a pas de variabilité de la taille du produit en fin de culture, au-delà du fait que ce sérotype ne présente pas à priori de problèmes de qualité en production. De plus, les profils extrêmement proches pour ces deux essais renforcent le caractère reproductible dans les conditions choline+. Concernant le sérotype 33F qui présente une problématique de taille en fin de culture, on constate une très nette amélioration de la conformité du KD (dans la spécification), en accord avec les résultats déjà présentés sur le modèle en conditions choline+. Les résultats sont donc très satisfaisants à ce stade du procédé.

II.4.2.2 Récolte

L'étape de récolte commence par la lyse cellulaire induite par le désoxycholate (sel biliaire et inducteur de l'autolysine), pour se terminer par une concentration du produit par ultrafiltration (figure 37, paragraphe VIII.3 du Matériel et Méthodes). Etant donné que le procédé de récolte est dimensionné pour des conditions standards de culture, on pouvait s'attendre à des difficultés au vue du doublement de la biomasse et de la quantité de capsule obtenue lors des trois essais. Concernant l'étape de lyse cellulaire, il avait été décidé au préalable de doubler la quantité de désoxycholate, en prévision du doublement de la quantité de biomasse. Ainsi, la lyse cellulaire qui dure classiquement 30 minutes a été allongée à 1 heure et demie par sécurité, après quoi l'observation au microscope a confirmé une lyse majoritaire. Les premières difficultés ont été rencontrées au niveau de la centrifugation en continu et de la clarification. En effet, le produit étant très chargé par rapport aux conditions habituelles, la centrifugeuse n'a pas pu éliminer correctement les débris cellulaires, ce qui a provoqué un colmatage des filtres clarifiants. Ainsi, les filtres ont du être changés une fois pour chaque essai réalisé, afin de poursuivre la phase de récolte.

Concernant l'étape d'ultrafiltration – concentration, le même type de problème s'est posé. Les débits ont été en conséquence pilotés à des valeurs plus faibles qu'en conditions standards, afin d'éviter des montées en pression trop importantes lors de la première concentration. Après diafiltration du produit, une deuxième concentration a pu être effectuée en éliminant environ la moitié du produit obtenu.

II.4.2.3 Purification

Je terminerai en précisant que les différents lots réalisés à l'échelle industrielle font actuellement l'objet d'essais dans le bâtiment de purification. Au moment où je rédige cet exposé, un lot de sérotype 8 a d'ores et déjà été testé, et les résultats semblent très encourageants aussi bien quant à la qualité du produit qu'au rendement. L'ensemble des lots devrait être purifié dans le courant de l'année 2008, ce qui permettra d'évaluer l'impact des modifications réalisées sur la culture bactérienne.

II.4.3 Conclusion sur les essais à l'échelle industrielle

La réalisation de ces essais directement au sein de l'unité de production a démontré qu'il était possible de transposer les conditions choline+ à l'échelle industrielle. En effet, l'ajustement des paramètres nutritionnels choline et glucose permet un gain de productivité significatif par rapport au modèle d'étude en conditions standards. Je tiens à préciser que ce gain de productivité a été calculé en regard des conditions standards obtenues dans le modèle 5 l (qui est mon référentiel), et non en production. L'analyse d'échantillons, en fin de culture standard à l'échelle industrielle, pour les sérotypes 8 et 33F montre que le gain de productivité en condition choline+ est probablement plus élevé que celui mentionné (figure 56). Ainsi, le gain se rapproche plus d'un facteur 3 pour le sérotype 8, et d'un facteur 4 pour le 33F, par rapport aux conditions standards industrielles.

Au-delà, les deux essais réalisés sur le sérotype 8 montrent une très bonne reproductibilité. Il s'agit là d'un point important étant donné le haut niveau de variabilité qui peut exister entre deux lots de production standards pour un même sérotype. La maîtrise de l'inoculum lors des différentes étapes, ainsi que les nouveaux paramètres nutritionnels sont sans aucun doute à l'origine de cette reproductibilité. La maîtrise de la qualité du produit est elle aussi confirmée à l'échelle industrielle pour le sérotype 33F. La réalisation de ces essais a par ailleurs montré que différents ajustements étaient nécessaires au niveau de la phase de récolte, en particulier au niveau des étapes de centrifugation et d'ultrafiltration. Je reviendrai plus en détail sur les différents ajustements à effectuer sur le procédé dans la partie Conclusion et Perspectives.

Pour conclure sur ces essais, la stratégie d'amélioration de ce procédé au niveau de la culture cellulaire s'est révélée très satisfaisante. En effet, les résultats suggèrent une résolution des deux problématiques énoncées au début de mon travail de thèse concernant le procédé Pneumo 23. De plus, ces modifications sont potentiellement efficaces pour l'ensemble des sérotypes, et devraient probablement améliorer la reproductibilité du procédé. Le fait d'avoir inscrit cette démarche rationnelle dans un contexte réglementaire a permis la réalisation des essais à l'échelle industrielle. Des essais supplémentaires ont été réalisés fin 2007 sur les sérotypes 5 (rendement) et 9V (taille) dont les résultats préliminaires sont positifs.

L'analyse complète de l'ensemble des lots réalisés en conditions de production industrielle pourrait permettre d'envisager un dépôt de variation du dossier d'AMM Pneumo23 en 2008. De plus, la modification de ces paramètres nutritionnels fait actuellement l'objet d'un dépôt de brevet de la part de Sanofi-Pasteur.

Chapitre IV : Conclusion et Perspectives

Du fait de sa dynamique de colonisation, suivie dans certains cas d'un processus d'infection, la bactérie pathogène *S. pneumoniae* dispose d'une forte capacité d'adaptation à son environnement. Ce micro-organisme a donc développé des réponses efficaces et nécessaires à son maintien dans l'hôte, et ce dans des conditions qui lui sont parfois défavorables. Constituant la deuxième cause de mortalité d'origine bactérienne dans le monde, de nombreuses études s'intéressent depuis les 30 dernières années à la mise en évidence des différents facteurs de pathogénicité, et aux mécanismes moléculaires impliqués dans leur régulation. Cependant, la compréhension de la physiologie de cette bactérie reste partielle, plus particulièrement en ce qui concerne le lien entre le fonctionnement du métabolisme et la mise en place de la virulence. De plus, la grande majorité de ces études utilise des conditions de culture non contrôlées, compliquant ainsi l'interprétation des résultats et l'établissement de corrélations. Ainsi, les mécanismes sous-tendant l'adaptabilité environnementale du pneumocoque, en lien avec la disponibilité nutritionnelle rencontrée dans l'hôte, n'ont été que partiellement caractérisés à ce jour (bien que le sujet fasse l'objet d'un intérêt grandissant). Avec pour origine une problématique liée à la production vaccinale, le comportement physiologique de *S. pneumoniae* en conditions de culture industrielle a été étudié, en lien avec la production de l'antigène d'intérêt qu'est le polysaccharide capsulaire. L'étude du polysaccharide capsulaire présente un intérêt particulier au niveau fondamental, puisqu'il est classiquement décrit comme la condition *sine qua non* de la virulence, et a permis d'établir la classification sérotypique de cette bactérie.

Cette démarche de compréhension a été réalisée en utilisant une approche de type biologie intégrative. Lors de cultures en conditions contrôlées permettant la maîtrise des cinétiques de croissance (paramètres physico-chimiques et nutritionnels analogues à ceux de la production), le métabolisme central ainsi que le niveau d'expression des gènes ont été analysés pour deux souches présentant des capacités différentielles de production capsulaire. Au-delà, des travaux de biologie moléculaire ont permis d'approfondir le niveau d'investigation vis-à-vis des résultats obtenus. Cette approche globale et intégrée a permis d'élargir les connaissances sur le comportement de *S. pneumoniae* en conditions de production industrielle, et plus particulièrement sur l'existence d'une corrélation entre activité métabolique et contrôle de la croissance et de la virulence. Dans un deuxième temps, cette démarche a été mise à profit dans l'optique d'une amélioration de la productivité du procédé industriel. Via l'ajustement d'un certain nombre de paramètres nutritionnels, un gain de productivité significatif a été obtenu, dont la faisabilité a été validée à l'échelle industrielle.

Connexion entre métabolisme central et virulence : un élément clé pour une meilleure compréhension ?

La maîtrise de l'environnement dans lequel s'effectue la production capsulaire du pneumocoque, en conditions industrielles, a permis la mise en évidence de fortes disparités dans le comportement des souches utilisées. Ces différences ont été identifiées aussi bien au niveau macrocinétique qu'au niveau moléculaire, pour lequel les profils d'accumulation observés au niveau du métabolisme central sont étroitement liés à l'expression d'un nombre important de gènes clés. L'analyse bioinformatique suivie de travaux de biologie moléculaire indique que CcpA, régulateur transcriptionnel du métabolisme carboné, est impliqué dans cette connexion et possède un rôle qui se situe au-delà. En effet, bien que nous ayons été confrontés à différentes difficultés au niveau technique, nous possédons à ce jour des arguments forts en faveur d'une implication directe ou indirecte de CcpA dans la régulation de la virulence de *S. pneumoniae*. Ainsi, ce régulateur interviendrait dans le contrôle de la synthèse capsulaire et l'assimilation de la choline qui en sont deux éléments essentiels. De plus, CcpA semble interagir de façon directe avec le métabolisme azoté, via par exemple l'induction de la synthèse et de l'assimilation des acides aminés branchés, ou encore la répression de CodY, répresseur transcriptionnel du métabolisme azoté. De cette manière, CcpA assurerait la disponibilité en facteurs nutritionnels nécessaires à la croissance tout en contrôlant la disponibilité énergétique via la glycolyse, et participerait en parallèle à l'adaptabilité environnementale via le contrôle de plusieurs facteurs de virulence (synthèse capsulaire, assimilation de la choline et protéines de surfaces). Ces considérations sont appuyées par différentes études démontrant d'une part que la capacité de colonisation et d'infection des mutants *ccpA*⁻ est fortement atténuée (Iyer *et al.*, 2005), et d'autre part que l'expression des gènes capsulaires est significativement altérée dans ces mêmes mutants (Giammarinaro et Paton, 2002). Toutefois, l'interprétation de l'effet de la mutation *ccpA*⁻ n'est pas si simple, le phénotype nutritionnel étant altéré, et de nombreuses observations étant probablement indirectes. Le fait qu'un mutant *ccpA*⁻ ait des capacités de colonisation et de virulence diminuées n'est pas surprenant. Ainsi, CcpA semble constituer un régulateur central de la physiologie de *S. pneumoniae* (confirmé par la forte altération de croissance des mutants), cette physiologie étant étroitement connectée à la virulence.

Ces arguments constituent des éléments importants pour la compréhension de différents phénomènes observés chez le pneumocoque, à commencer par la diversité de virulence observée entre les différents sérotypes et plus généralement d'une souche à une autre. En effet, il est désormais bien établi que parmi les 90 sérotypes de *S. pneumoniae* présents dans la nature, certains d'entre eux sont connus pour être plus virulents que d'autres. Ce différentiel est classiquement attribué aux propriétés biologiques du type capsulaire lui-même, mais aussi à la capacité de le produire (Paton et Morona, 2007). Ainsi, une régulation CcpA-dépendante au niveau de la région amont de l'opéron *cps* pourrait constituer un des éléments de cette diversité. En effet, il existe d'un sérotype à un autre une forte variabilité génétique dans cette zone, du fait notamment de la présence de séquences d'insertion. Cette variabilité existe au sein même d'un sérotype (voire même au sein de différents isolats d'un même sérotype), puisque le séquençage de notre isolat de sérotype 4 (souche Sanofi-Pasteur) présente une région amont équivalente à une souche dont l'opéron *cps* a été séquencé (Bentley *et al.*, 2006) (numéro d'accèsion Genbank CR931635), mais différente de celle observée pour la souche entièrement séquencée TIGR4. De par la présence de ces séquences d'insertions, le RUPA contenant le site *cre* potentiel peut se positionner jusqu'à plus de 3 kb de l'opéron *cps*, ce qui pourrait en conséquence impacter l'expression. Bien qu'aucune corrélation n'ait été établie pour le moment entre positionnement de ces séquences et virulence, une analyse plus précise de la topologie de cette région (existence de repliements particuliers par exemple), pour l'ensemble des sérotypes dont la séquence est disponible, pourrait apporter des éléments de réponse. Au-delà, ce type de régulation pourrait être conservé chez d'autres espèces Gram+ (à faible contenu en G+C) produisant une capsule, de par la présence de sites *cre* potentiels en amont des locus impliqués dans la synthèse capsulaire (Annexe 10). Toutefois, le positionnement de ces séquences ne peut être l'unique explication d'une telle variabilité, ce qui nécessite la prise en compte d'un contexte plus global qui est l'environnement dans lequel les souches évoluent. En effet, le lien étroit entre physiologie et virulence suggère que la variabilité de disponibilité nutritionnelle rencontrée par la bactérie doit jouer un rôle essentiel.

L'exemple type est le phénomène de variation de phase, décrit chez le pneumocoque comme une évolution morphologique entre la niche de colonisation, le nasopharynx, et le site d'infection qu'est le sang (soit deux environnements très différents). La dénomination de variation de phase est quelque peu abusive, dans la mesure où ce terme est classiquement employé pour des populations génétiquement distinctes, ce qui n'a jamais été démontré pour

le moment. Le phénotype classiquement observé au niveau du nasopharynx, le variant transparent, est caractérisé par une fine couche de polysaccharide capsulaire et un niveau élevé d'acides teichoïques. Une telle morphologie est adaptée au besoin d'adhérence, de par une meilleure exposition des protéines de surface. Par opposition, la grande majorité des pneumocoques récupérés dans le sang sont décrits comme opaques, avec une capsule plus épaisse et de faibles quantités de TA. Un tel phénotype permet notamment une meilleure protection vis-à-vis du système immunitaire (Kim *et al.*, 1999). Concernant la compréhension de cette évolution morphologique, les études restent relativement limitées à ce jour (partie IV, Bibliographie).

L'analyse de la disponibilité nutritionnelle dans chacune des niches apporte cependant des éléments de réponse, en lien avec nos observations. En effet, la concentration en carbohydrates est très variable entre les deux niches : de l'ordre de 5 à 40 μM dans le nasopharynx pour 5 mM dans le sang. Si on relie la capacité de synthèse capsulaire à la disponibilité en source de carbone rapidement métabolisable d'une part, et à la disponibilité en précurseurs d'autre part, le sang constitue une niche beaucoup plus favorable que le nasopharynx. En effet, la concentration constante en glucose dans le sang doit probablement maintenir une activité métabolique, permettant l'accumulation d'intermédiaires glycolytiques clés comme le FDP, tout en assurant la demande énergétique nécessaire. D'autre part, une étude récente suggère que la disponibilité en précurseurs de type UTP est essentielle pour l'observation d'un phénotype opaque (Stroeher et Paton, 2007). Comme déjà présenté (cf. paragraphe II.3.2, Bibliographie), la synthèse des précurseurs nécessaire à la formation de l'UDP-glucose, point de départ de la synthèse capsulaire, est directement reliée au métabolisme de la glutamine. Or, la glutamine est l'acide aminé libre dont le titre est classiquement le plus élevé dans le sang (Bachmann *et al.*, 1979). De cette manière, le sang permettrait d'assurer l'exigence nutritionnelle nécessaire à la synthèse capsulaire. Au-delà, le lien potentiel entre assimilation de la choline et métabolisme carboné aurait un sens, puisque le plasma sanguin est très pauvre en choline (0,001 g/l pour une personne normale) (Zeisel, 2000). Dans ces conditions, l'induction de *licI* pourrait donc constituer une réponse à cette carence. Au niveau du nasopharynx, la faible disponibilité en carbohydrates a déjà été décrite comme favorable à la colonisation, avec par exemple BgaA, beta-galactosidase de surface impliquée dans l'adhésion et réprimée par CcpA (Kaufman et Yother, 2007). L'observation d'un phénotype faiblement capsulé n'est donc pas illogique si on considère que les épithéliums et le mucus qui les recouvre ne présentent que peu de carbone rapidement

métabolisable. De plus, la présence d'oxygène à ce niveau (fixé par l'hémoglobine dans le sang) doit probablement affecter l'activité métabolique de la cellule. Comme décrit précédemment (paragraphe II.3.1.4, Bibliographie), deux activités liées à la glycolyse et utilisant l'oxygène sont présentes chez le pneumocoque, à savoir la NADH oxydase (productrice de NAD^+) et la pyruvate oxydase (productrice de H_2O_2). Bien que la production d' H_2O_2 soit favorable à la colonisation, la présence d'oxygène est susceptible de faire baisser le ratio $\text{NADH} / \text{NAD}^+$, et par conséquent ne plus favoriser l'accumulation de certains métabolites clés (FDP et trioses-P dont l'accumulation est due à la réaction limitante de la glycolyse, $\text{GAP} \rightarrow 1,3\text{PG}$, consommatrice de NAD^+). De cette manière, le contrôle exercé par CcpA sur un nombre important de gènes serait encore plus atténué dans cette niche écologique.

Malgré cela, la disponibilité en choline au niveau du nasopharynx semble pour sa part assurée par des activités de dégradation sur les cellules de l'hôte, déjà identifiées chez *H. influenzae* qui colonise la même zone (Fan *et al.*, 2001). Toutefois, la différence de disponibilité nutritionnelle n'explique pas pourquoi il existe, a priori, une différence dans la quantité d'acides teichoïques entre les variants opaques et transparents. En effet, nos résultats indiquent que la quantité de TA est directement corrélée à la biomasse, renforcés par l'interconnexion entre synthèse des TA et de la paroi (Damjanovic *et al.*, 2007). Ainsi, la synthèse des TA semble plus constitutive que sujette à des variations, même si cela reste à confirmer. Quoiqu'il en soit, la disponibilité nutritionnelle de chacune des niches de colonisation semble jouer un rôle important dans l'évolution morphologique du pneumocoque, et donc dans sa virulence. Il est donc plausible que les systèmes de régulation mis en jeu aient évolués, de façon à faciliter l'exploitation des différentes niches.

En effet, la disponibilité nutritionnelle ne constitue qu'un élément de la compréhension de la variabilité de virulence des différences souches. L'exemple type est la mise en culture sur boîte de Petri d'un isolat capsulé (opaque) de *S. pneumoniae*, qui se traduit par l'apparition d'une population composée à la fois de variants opaques et transparents (Serrano *et al.*, 2006). Cette observation signifie qu'un même isolat est capable de donner différents phénotypes dans un même environnement. Une telle hétérogénéité rappelle le concept de bistabilité, pour lequel une population de cellules génétiquement identique, cultivée dans des conditions homogènes est capable de « bifurquer » vers différentes sous populations phénotypiquement distinctes de façon stochastique. Un des exemples les plus classiques de ce phénomène est l'état de compétence observé chez

B. subtilis (comme chez le pneumocoque), qui au sein d'une culture se manifeste seulement pour 10 % de la population cellulaire sans distinctions au niveau génétique. En effet, la bistabilité est un mécanisme décrit comme épigénétique, qui ne se traduit pas par des mutations. Son existence implique la notion de seuil d'expression d'un gène, qui lorsqu'il est franchit peut se manifester par la bascule vers un phénotype, notamment lorsqu'il s'agit d'un régulateur central. Dans le cas de ComK, régulateur central de la compétence, les fluctuations aléatoires dans le niveau de synthèse et de dégradation du gène vont agir sur la sélection des cellules. Ainsi, la concentration de ComK peut dépasser un seuil dans certaines cellules conduisant à l'état de compétence (Dubnau et Losick, 2006). Un tel exemple pourrait être pris en compte dans la variabilité de virulence que l'on peut observer chez *S. pneumoniae*. En effet, des régulateurs globaux comme CcpA, CiaR ou CodY pourraient être sujets à de tels mécanismes, et donc favoriser la diversité des populations. Ce type de mécanisme pourrait expliquer, de la même manière, pourquoi les différents sérotypes cultivés en conditions industrielles ont des capacités différentes à consommer le glucose, et donc à faire de la biomasse. En effet, les gènes du métabolisme carboné sont généralement très conservés, et un ajustement du niveau de régulation de ces gènes semble plus probable qu'une explication génétique. Enfin, le fait que le sérotype 5 présente une sensibilité accrue à la choline, sans raison génétique apparente, pourrait s'expliquer par le même type de phénomène.

Je terminerai en disant que la réalisation d'un tel projet démontre à l'industriel que la compréhension du comportement physiologique des microorganismes qu'il utilise pour la production vaccinale est essentielle. Elle permet d'une part de mieux appréhender la manière dont le procédé fonctionne et a été mis en place, et d'autre part d'identifier les problèmes lorsqu'ils se manifestent. De plus, cette compréhension est généralement une base solide dans l'optique d'une amélioration de productivité, ce qui a été le cas pour mon travail de thèse. Dans ce cadre, une collaboration devrait se poursuivre entre mon équipe du CNRS de Toulouse et Sanofi-Pasteur, pour d'autres procédés de production.

Perspectives

✓ Au niveau fondamental

Comme présenté précédemment, plusieurs travaux sont actuellement en cours, afin d'avoir une vision plus détaillée des mécanismes de régulation des opérons *cps* et *lic1*. Au-delà, l'existence d'une importante diversité génétique au niveau de la région amont de l'opéron *cps* mérite une analyse plus approfondie, qui nécessite de disposer d'un nombre important de souches différentes. Une telle analyse devrait permettre de surcroît une meilleure compréhension de la cascade de régulation assurée par les premiers gènes de l'opéron capsulaire, encore mal comprise à ce jour. La collaboration avec l'équipe de Jean-Pierre Claverys devrait se poursuivre elle aussi, afin d'évaluer les connexions éventuelles entre le mécanisme de compétence et la physiologie du pneumocoque. L'ensemble de ces futurs travaux devrait probablement s'inscrire dans le programme européen Pneumopath, actuellement en cours d'expertise, dont l'un des objectifs est de relier la capacité de virulence du pneumocoque à sa biodiversité.

✓ Au niveau industriel

Les améliorations apportées sur le procédé industriel Pneumo 23, en termes de productivité, font actuellement l'objet d'une procédure de dépôt de brevet par Sanofi-Pasteur. De plus, un dépôt de variation du dossier d'AMM du vaccin Pneumo 23 est envisagé pour 2008. Dans ce cadre, plusieurs essais à l'échelle industrielle sont planifiés sur d'autres sérotypes d'ici la fin de l'année 2007. Ces modifications ont permis par ailleurs d'engager une réflexion plus globale sur d'autres optimisations à apporter aux différentes étapes.

Ainsi, la maîtrise de l'inoculum est une première évidence, et nécessite de ce fait que le passage d'une étape à une autre s'effectue sur des bases de DO cibles (et donc de taux de croissance), et non des bases de temps de culture. Il en est de même pour la culture en fermenteur industriel dont l'arrêt devrait être planifié en accord avec l'arrêt de croissance, ou encore l'épuisement de la source de carbone. Concernant les précultures en milieu solide, il existe une forte lyse à la fin du deuxième passage, dont la conséquence est une incertitude sur le démarrage de croissance lors du passage en cultures liquides. De plus, les deux premiers

passages représentent un temps total de 36 h, ce qui peut constituer une perte de temps importante. Ainsi, une amélioration pourrait consister à travailler en précultures liquides à partir du lyophilisat, ce qui permettrait d'une part la maîtrise de la culture, et d'autre part une diminution de la durée des différentes étapes. Travailler avec un inoculum congelé dérivé du lyophilisat serait d'ailleurs une stratégie envisageable dans cette optique, tout en conservant les lyophilisats pour un stockage à long terme. Concernant la lyse des cellules au désoxycholate de sodium, des discussions ont déjà été engagées sur le besoin de les réaliser à 37°C plutôt qu'à 15°C, comme cela est fait actuellement. En effet, la lyse en présence de sels biliaires permet l'induction de l'autolysine LytA, dont le fonctionnement sera meilleur à 37°C. Enfin, un certain nombre d'adaptations devront être prise en compte au niveau de la récolte et de la purification, en lien avec la quantité de biomasse et de polysaccharide obtenus par les modifications apportées.

Au-delà, plusieurs questions se posent quant à l'avenir du vaccin Pneumo 23. Bien que la multiplicité des sérotypes qu'il couvre lui donne encore tout son intérêt, la nécessité de mettre sur le marché des vaccins conjugués, comme cela a été fait par certains concurrents, est évidente (couverture des enfants de moins de 2 ans). Il est en effet important de rappeler que les vaccins conjugués ont l'avantage d'assurer la protection des enfants de moins de 2 ans, par l'induction de la mémoire lymphocytaire qui ne peut être assurée par la simple présence du polysaccharide capsulaire. De plus, l'évolution sérotypique donne tout son sens à l'utilisation de nouveaux antigènes, notamment des protéines de surfaces du pneumocoque pour lesquelles de nombreuses études ont déjà été menées. Enfin, l'utilisation de stratégies recombinantes pour la production de polysaccharide capsulaire, tout comme d'autres antigènes, devrait être prise en compte dans cette réflexion compte tenu de la multiplicité des sérotypes. Le concept de souches recombinantes contenant les locus capsulaires d'intérêt est une option réaliste pour la production de vaccins de nouvelle génération.

Références Bibliographiques

- Abeyta M, Hardy G G et Yother J (2003) Genetic Alteration of Capsule Type but Not PspA Type Affects Accessibility of Surface-Bound Complement and Surface Antigens of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **71**: pp 218-225.
- Andrew PW, Mitchell T J et Morgan P J (1997) Relationship of Structure to Function in Pneumolysin. *Microb Drug Resist* **3**: pp 11-17.
- Arminjon F et Donikian R (1983) Method for purifying polyosides of *Streptococcus pneumoniae* and vaccine based on polyosides thus purified. GB19820023061 19811211 [GB2102291]. 2-2-1983. Brevet européen.
- Arnau J, Jorgensen F, Madsen S M, Vrang A et Israelsen H (1997) Cloning, Expression, and Characterization of the *Lactococcus lactis* Pfl Gene, Encoding Pyruvate Formate-Lyase. *J Bacteriol* **179**: pp 5884-5891.
- Arnau J, Jorgensen F, Madsen S M, Vrang A et Israelsen H (1998) Cloning of the *Lactococcus lactis* AdhE Gene, Encoding a Multifunctional Alcohol Dehydrogenase, by Complementation of a Fermentative Mutant of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **180**: pp 3049-3055.
- Arrecubieta C, Lopez R et Garcia E (1996) Type 3-Specific Synthase of *Streptococcus pneumoniae* (Cap3B) Directs Type 3 Polysaccharide Biosynthesis in *Escherichia coli* and in Pneumococcal Strains of Different Serotypes. *J Exp Med* **184**: pp 449-455.
- Austrian R (1981) Pneumococcus: the First One Hundred Years. *Rev Infect Dis* **3**: pp 183-189.
- Austrian R, Bernheimer H P, Smith E E et Mills G.T (1959) Simultaneous Production of Two Capsular Polysaccharides by Pneumococcus. II. The Genetic and Biochemical Bases of Binary Capsulation. *J Exp Med* **110**: pp 585-602.
- Bachmann EW, Frei J et Muhlmann M (1979) Determination of Amino Acids in Human Plasma by High-Pressure Liquid Chromatography. *Chromatographia* **12**: pp 345-349.
- Baltz RH, Norris F H, Matsushima P, Dehoff B S, Rockey P, Porter G, Burgett S, Peery R, Hoskins J, Braverman L, Jenkins I, Solenberg P, Young M, McHenney M A, Rosteck P R et Skatrud P L (2000) DNA sequence sampling and gene disruption for identification of new antibacterial targets. Dans *Streptococcus Pneumoniae: Molecular Biology et Mechanisms of Disease* (Tomasz A. ed) pp 33-44, Larchmont, N.Y.
- Barocchi MA, Censini S et Rappuoli R (2007) Vaccines in the Era of Genomics: the Pneumococcal Challenge. *Vaccine* **25**: pp 2963-2973.
- Behr T, Fischer W, Peter-Katalinic J et Egge H (1992) The Structure of Pneumococcal Lipoteichoic Acid. Improved Preparation, Chemical and Mass Spectrometric Studies. *Eur J Biochem* **207**: pp 1063-1075.

- Bender MH, Cartee R T et Yother J (2003) Positive Correlation Between Tyrosine Phosphorylation of CpsD and Capsular Polysaccharide Production in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **185**: pp 6057-6066.
- Bender MH et Yother J (2001) CpsB Is a Modulator of Capsule-Associated Tyrosine Kinase Activity in *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem* **276**: pp 47966-47974.
- Bentley SD, Aanensen D M, Mavroidi A, Saunders D, Rabinowitsch E, Collins M, Donohoe K, Harris D, Murphy L, Quail M A, Samuel G, Skovsted I C, Kalltoft M S, Barrell B, Reeves P R, Parkhill J et Spratt B G (2006) Genetic Analysis of the Capsular Biosynthetic Locus From All 90 Pneumococcal Serotypes. *PLoS Genet* **2**: pp 31-44.
- Berry AM, Lock R A et Paton J C (1996) Cloning and Characterization of NanB, a Second *Streptococcus pneumoniae* Neuraminidase Gene, and Purification of the NanB Enzyme From Recombinant *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**: pp 4854-4860.
- Beynon LM, Richards J C et Perry M B (1997) Identification of the Common Antigenic Determinant Shared by *Streptococcus pneumoniae* Serotypes 35A and 20 Capsular Polysaccharides-Structural Analysis of the *Streptococcus pneumoniae* Serotype 35A Capsular Polysaccharide. *Eur J Biochem* **250**: pp 163-167.
- Bingen E, Levy C, de la R F, Boucherat M, Varon E, Alonso J M, Dabernat H, Reinert P, Aujard Y et Cohen R (2005) Bacterial Meningitis in Children: a French Prospective Study. *Clin Infect Dis* **41**: pp 1059-1063.
- Blencke HM, Homuth G, Ludwig H, Mader U, Hecker M et Stulke J (2003) Transcriptional Profiling of Gene Expression in Response to Glucose in *Bacillus subtilis*: Regulation of the Central Metabolic Pathways. *Metab Eng* **5**: pp 133-149.
- Bogaert D, de Groot R et Hermans P W (2004a) *Streptococcus pneumoniae* Colonisation: the Key to Pneumococcal Disease. *Lancet Infect Dis* **4**: pp 144-154.
- Bogaert D, Hermans P W, Adrian P V, Rumke H C et de Groot R (2004b) Pneumococcal Vaccines: an Update on Current Strategies. *Vaccine* **22**: pp 2209-2220.
- Boulnois GJ, Paton J C, Mitchell T J et Andrew P W (1991) Structure and Function of Pneumolysin, the Multifunctional, Thiol-Activated Toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **5**: pp 2611-2616.
- Braun JS, Sublett J E, Freyer D, Mitchell T J, Cleveland J L, Tuomanen E I et Weber J R (2002) Pneumococcal Pneumolysin and H₂O₂ Mediate Brain Cell Apoptosis During Meningitis. *J Clin Invest* **109**: pp 19-27.
- Breuer, T. Streptorix – Going Beyond Prevnar. 2007. Communication personnelle.
- Briles DE, Novak L, Hotomi M, van Ginkel F W et King J (2005) Nasal Colonization With *Streptococcus pneumoniae* Includes Subpopulations of Surface and Invasive Pneumococci. *Infect Immun* **73**: pp 6945-6951.
- Brown SW et Sonenshein A L (1996) Autogenous Regulation of the *Bacillus subtilis* GlnRA Operon. *J Bacteriol* **178**: pp 2450-2454.

- Browngardt CM, Wen Z T et Burne R A (2004) RegM is Required for Optimal Fructosyltransferase and Glucosyltransferase Gene Expression in *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett* **240**: pp 75-79.
- Bumbaca D, Littlejohn J E, Nayakanti H, Rigden D J, Galperin M Y et Jedrzejewski M J (2004) Sequence Analysis and Characterization of a Novel Fibronectin-Binding Repeat Domain From the Surface of *Streptococcus pneumoniae*. *OMICS* **8**: pp 341-356.
- Chapuy-Regaud S, Duthoit F, Malfroy-Mastrorillo L, Gourdon P, Lindley N D et Trombe M C (2001) Competence Regulation by Oxygen Availability and by Nox is Not Related to Specific Adjustment of Central Metabolism in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **183**: pp 2957-2962.
- Chastanet A, Prudhomme M, Claverys J P et Msadek T (2001) Regulation of *Streptococcus pneumoniae* Clp Genes and Their Role in Competence Development et Stress Survival. *J Bacteriol* **183**: pp 7295-7307.
- Claverys JP et Havarstein L S (2002) Extracellular-Peptide Control of Competence for Genetic Transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Front Biosci* **7**: pp d1798-d1814.
- Claverys JP, Prudhomme M, Mortier-Barriere I et Martin B (2000) Adaptation to the Environment: *Streptococcus pneumoniae*, a Paradigm for Recombination-Mediated Genetic Plasticity? *Mol Microbiol* **35**: pp 251-259.
- Cocaign-Bousquet M, Garrigues C, Loubiere P et Lindley N D (1996) Physiology of Pyruvate Metabolism in *Lactococcus lactis*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **70**: pp 253-267.
- Coffey TJ, Enright M C, Daniels M, Morona J K, Morona R, Hryniewicz W, Paton J C et Spratt B G (1998) Recombinational Exchanges at the Capsular Polysaccharide Biosynthetic Locus Lead to Frequent Serotype Changes Among Natural Isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **27**: pp 73-83.
- Cundell DR, Gerard N P, Gerard C, Idanpaan-Heikkila I et Tuomanen E I (1995) *Streptococcus pneumoniae* Anchor to Activated Human Cells by the Receptor for Platelet-Activating Factor. *Nature* **377**: pp 435-438.
- Cundell DR et Tuomanen E I (1994) Receptor Specificity of Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to Human Type-II Pneumocytes and Vascular Endothelial Cells in Vitro. *Microb Pathog* **17**: pp 361-374.
- Dagkessamanskaia A, Moscoso M, Henard V, Guiral S, Overweg K, Reuter M, Martin B, Wells J et Claverys J P (2004) Interconnection of Competence, Stress et CiaR Regulons in *Streptococcus pneumoniae*: Competence Triggers Stationary Phase Autolysis of CiaR Mutant Cells. *Mol Microbiol* **51**: pp 1071-1086.
- Damjanovic M, Kharat A S, Eberhardt A, Tomasz A et Vollmer W (2007) The Essential *tacF* Gene is Responsible for the Choline-Dependent Growth Phenotype of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **189**: pp 7105-7111.

- Dashper SG, Riley P F et Reynolds E C (1995) Characterization of Glutamine Transport in *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol* **10**: pp 183-187.
- De Las Rivas B, Garcia J L, Lopez R et Garcia P (2001) Molecular Characterization of the Pneumococcal Teichoic Acid Phosphorylcholine Esterase. *Microb Drug Resist* **7**: pp 213-222.
- De Las Rivas B, Garcia J L, Lopez R et Garcia P (2002) Purification and Polar Localization of Pneumococcal LytB, a Putative Endo-Beta-N-Acetylglucosaminidase: the Chain-Dispersing Murein Hydrolase. *J Bacteriol* **184**: pp 4988-5000.
- De Vuyst L et Degeest B (1999) Heteropolysaccharides From Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **23**: pp 153-177.
- Delcher AL, Phillippy A, Carlton J et Salzberg S L (2002) Fast Algorithms for Large-Scale Genome Alignment et Comparison. *Nucleic Acids Res* **30**: pp 2478-2483.
- den Hengst CD, van Hijum S A, Geurts J M, Nauta A, Kok J et Kuipers O P (2005) The *Lactococcus lactis* CodY Regulon: Identification of a Conserved Cis-Regulatory Element. *J Biol Chem* **280**: pp 34332-34342.
- Deng L, Kasper D L, Krick T P et Wessels M R (2000) Characterization of the Linkage Between the Type III Capsular Polysaccharide et the Bacterial Cell Wall of Group B Streptococcus. *J Biol Chem* **275**: pp 7497-7504.
- Desai BV, Reiter H et Morrison D A (2003) Choline Starvation Induces the Gene *licD2* in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **185**: pp 371-373.
- Deutscher J, Fischer C, Charrier V, Galinier A, Lindner C, Darbon E et Dossonnet V (1997) Regulation of Carbon Metabolism in Gram-Positive Bacteria by Protein Phosphorylation. *Folia Microbiol (Praha)* **42**: pp 171-178.
- Deutscher J., Francke C. et Postma P.W. (2006) How Phosphotransferase System-Related Protein Phosphorylation Regulates Carbohydrate Metabolism in Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: pp 939-1031
- Deutscher J, Herro R, Bourand A, Mijakovic I et Poncet S (2005) P-Ser-HPr--a Link Between Carbon Metabolism and the Virulence of Some Pathogenic Bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1754**: pp 118-125.
- Dillard JP et Yother J (1994) Genetic and Molecular Characterization of Capsular Polysaccharide Biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae* Type 3. *Mol Microbiol* **12**: pp 959-972.
- Drlica K et Zhao X (1997) DNA Gyrase, Topoisomerase IV, and the 4-Quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: pp 377-392.
- Dubnau D et Losick R (2006) Bistability in Bacteria. *Mol Microbiol* **61**: pp 564-572.

- Even S, Garrigues C, Loubiere P, Lindley N D et Cocaign-Bousquet M (1999) Pyruvate Metabolism in *Lactococcus lactis* is Dependent Upon Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Activity. *Metab Eng* **1**: pp 198-205.
- Fan X, Goldfine H, Lysenko E et Weiser J N (2001) The Transfer of Choline From the Host to the Bacterial Cell Surface Requires GlpQ in *Haemophilus influenzae*. *Mol Microbiol* **41**: pp 1029-1036.
- Felmingham D, Reinert R R, Hirakata Y et Rodloff A (2002) Increasing Prevalence of Antimicrobial Resistance Among Isolates of *Streptococcus pneumoniae* From the PROTEKT Surveillance Study, et Compatative in Vitro Activity of the Ketolide, Telithromycin. *J Antimicrob Chemother* **50 Suppl S1**: pp 25-37.
- File TM (2003) Community-Acquired Pneumonia. *Lancet* **362**: pp 1991-2001.
- Fillinger S, Boschi-Muller S, Azza S, Dervyn E, Branlant G et Aymerich S (2000) Two Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenases With Opposite Physiological Roles in a Nonphotosynthetic Bacterium. *J Biol Chem* **275**: pp 14031-14037.
- Fischer W (2000) Phosphocholine of Pneumococcal Teichoic Acids: Role in Bacterial Physiology and Pneumococcal Infection. *Res Microbiol* **151**: pp 421-427.
- Fisher SH (1999) Regulation of Nitrogen Metabolism in *Bacillus subtilis*: Vive La Difference! *Mol Microbiol* **32**: pp 223-232.
- Galinier A, Kravanja M, Engelmann R, Hengstenberg W, Kilhoffer M C, Deutscher J et Haiech J (1998) New Protein Kinase and Protein Phosphatase Families Mediate Signal Transduction in Bacterial Catabolite Repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: pp 1823-1828.
- Garcia P, Garcia J L, Garcia E et Lopez R (1986) Nucleotide Sequence et Expression of the Pneumococcal Autolysin Gene From Its Own Promoter in Escherichia Coli. *Gene* **43**: pp 265-272.
- Garcia P, Gonzalez M P, Garcia E, Lopez R et Garcia J L (1999) LytB, a Novel Pneumococcal Murein Hydrolase Essential for Cell Separation. *Mol Microbiol* **31**: pp 1275-1281.
- Garcia-Rodriguez JA et Fresnadillo Martinez M J (2002) Dynamics of Nasopharyngeal Colonization by Potential Respiratory Pathogens. *J Antimicrob Chemother* **50 Suppl S2**: pp 59-73.
- Garrigues C, Loubiere P, Lindley N D et Cocaign-Bousquet M (1997) Control of the Shift From Homolactic Acid to Mixed-Acid Fermentation in *Lactococcus lactis*: Predominant Role of the NADH/NAD⁺ Ratio. *J Bacteriol* **179**: pp 5282-5287.
- Ghaffar F, Friedland I R et McCracken G H, Jr. (1999) Dynamics of Nasopharyngeal Colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Pediatr Infect Dis J* **18**: pp 638-646.

- Giammarinaro P et Paton J C (2002) Role of RegM, a Homologue of the Catabolite Repressor Protein CcpA, in the Virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **70**: pp 5454-5461.
- Gilbert RJ, Jimenez J L, Chen S, Tickle I J, Rossjohn J, Parker M, Andrew P W et Saibil H R (1999) Two Structural Transitions in Membrane Pore Formation by Pneumolysin, the Pore-Forming Toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Cell* **97**: pp 647-655.
- Gosink KK, Mann E R, Guglielmo C, Tuomanen E I et Masure H R (2000) Role of Novel Choline Binding Proteins in Virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **68**: pp 5690-5695.
- Grangeasse C, Cozzone AJ, Deutscher J, Mijakovic I (2007) Tyrosine phosphorylation: an emerging regulatory device of bacterial physiology. *Trends Biochem Sci.* **32**(2): pp 86-94
- Grijalva CG, Nuorti J P, Arbogast P G, Martin S W, Edwards K M et Griffin M R (2007) Decline in Pneumonia Admissions After Routine Childhood Immunisation With Pneumococcal Conjugate Vaccine in the USA: a Time-Series Analysis. *Lancet* **369**: pp 1179-1186.
- Guenzi E, Gasc A M, Sicard M A et Hakenbeck R (1994) A Two-Component Signal-Transducing System is Involved in Competence and Penicillin Susceptibility in Laboratory Mutants of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **12**: pp 505-515.
- Halfmann A, Kovacs M, Hakenbeck R et Bruckner R (2007) Identification of the Genes Directly Controlled by the Response Regulator CiaR in *Streptococcus pneumoniae*: Five Out of 15 Promoters Drive Expression of Small Non-Coding RNAs. *Mol Microbiol* **66**(1): pp 110-126.
- Hammerschmidt S, Bethe G, Remane P H et Chhatwal G S (1999) Identification of Pneumococcal Surface Protein A as a Lactoferrin-Binding Protein of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **67**: pp 1683-1687.
- Hardy GG, Magee A D, Ventura C L, Caimano M J et Yother J (2001) Essential Role for Cellular Phosphoglucomutase in Virulence of Type 3 *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **69**: pp 2309-2317.
- Hausdorff WP, Feikin D R et Klugman K P (2005) Epidemiological Differences Among Pneumococcal Serotypes. *Lancet Infect Dis* **5**: pp 83-93.
- Hendriksen WT, Bootsma H J, Estevao S, Hoogenboezem A J, de Groot A, Kuipers O P et Hermans P (2008) CodY of *Streptococcus pneumoniae*: Link Between Nutritional Gene Regulation and Virulence. *J Bacteriol* **190** pp 590-601.
- Henkin TM (1996) The Role of CcpA Transcriptional Regulator in Carbon Metabolism in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* **135**: pp 9-15.
- Henrichsen J (1995) Six Newly Recognized Types of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* **33**: pp 2759-2762.

- Hirst RA, Kadioglu A, O'callaghan C et Andrew P W (2004) The Role of Pneumolysin in Pneumococcal Pneumonia and Meningitis. *Clin Exp Immunol* **138**: pp 195-201.
- Hoeprich PD (1955) C14 Labelling of *Diplococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **69**: pp 682-688.
- Holmes AR, McNab R, Millsap K W, Rohde M, Hammerschmidt S, Mawdsley J L et Jenkinson H F (2001) The PavA Gene of *Streptococcus pneumoniae* Encodes a Fibronectin-Binding Protein that is Essential for Virulence. *Mol Microbiol* **41**: pp 1395-1408.
- Holtje JV et Tomasz A (1976) Purification of the Pneumococcal N-Acetylmuramyl-L-Alanine Amidase to Biochemical Homogeneity. *J Biol Chem* **251**: pp 4199-4207.
- Hoskins J, Alborn W E, Jr., Arnold J, Blaszczyk L C, Burgett S, DeHoff B S, Estrem S T, Fritz L, Fu D J, Fuller W, Geringer C, Gilmour R, Glass J S, Khoja H, Kraft A R, Lagace R E, LeBlanc D J, Lee L N, Lefkowitz E J, Lu J, Matsushima P, McAhren S M, McHenney M, McLeaster K, Mundy C W, Nicas T I, Norris F H, O'Gara M, Peery R B, Robertson G T, Rockey P, Sun P M, Winkler M E, Yang Y, Young-Bellido M, Zhao G, Zook C A, Baltz R H, Jaskunas S R, Rosteck P R, Jr., Skatrud P L et Glass J I (2001) Genome of the Bacterium *Streptococcus pneumoniae* Strain R6. *J Bacteriol* **183**: pp 5709-5717.
- Hubben GA, Bos J M, Glynn D M, van der E A, van Alphen L et Postma M J (2007) Enhanced Decision Support for Policy Makers Using a Web Interface to Health-Economic Models--Illustrated With a Cost-Effectiveness Analysis of Nation-Wide Infant Vaccination With the 7-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine in the Netherlands. *Vaccine* **25**: pp 3669-3678.
- Iyer R, Baliga N S et Camilli A (2005) Catabolite Control Protein A (CcpA) Contributes to Virulence and Regulation of Sugar Metabolism in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **187**: pp 8340-8349.
- Jamet, E. Etude de l'expression et de la régulation des gènes impliqués dans le métabolisme carboné chez *Lactococcus lactis*. 2001. Thèse, Institut National Agronomique de Paris-Grignon, France.
- Jansson PE, Lindberg B, Anderson M, Lindquist U et Henrichsen J (1988) Structural Studies of the Capsular Polysaccharide From *Streptococcus pneumoniae* Type 2, a Reinvestigation. *Carbohydr Res* **182**: pp 111-117.
- Jansson PE, Lindberg B et Lindquist U (1981) Structural Studies of the Capsular Polysaccharide From *Streptococcus pneumoniae* Type 4. *Carbohydr Res* **95**: pp 73-80.
- Jansson PE, Lindberg B et Lindquist U (1985) Structural Studies of the Capsular Polysaccharide From *Streptococcus pneumoniae* Type 5. *Carbohydr Res* **140**: pp 101-110.
- Jansson PE, Lindberg B, Lindquist U et Ljungberg J (1987) Structural Studies of the Capsular Polysaccharide From *Streptococcus pneumoniae* Types 15B and 15C. *Carbohydr Res* **162**: pp 111-116.

- Jansson PE, Lindberg J, Wimalasiri K M et Henrichsen J (1991) The Structure of the Capsular Polysaccharide From *Streptococcus pneumoniae* Type 7B. *Carbohydr Res* **217**: pp 171-180.
- Jedrzejewski MJ (2000) Structural and Functional Comparison of Polysaccharide Degrading-Enzyme. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **35**: pp 221-251.
- Jedrzejewski MJ (2007) Unveiling Molecular Mechanisms of Bacterial Surface Proteins: *Streptococcus pneumoniae* as a Model Organism for Structural Studies. *Cell Mol Life Sci*. ND.
- Jedrzejewski MJ, Mello L V, de Groot B L et Li S (2002) Mechanism of Hyaluronan Degradation by *Streptococcus pneumoniae* Hyaluronate Lyase. Structures of Complexes with the Substrate. *J Biol Chem* **277**: pp 28287-28297.
- Jefferies JM, Smith A, Clarke S C, Dowson C et Mitchell T J (2004) Genetic Analysis of Diverse Disease-Causing Pneumococci Indicates High Levels of Diversity Within Serotypes and Capsule Switching. *J Clin Microbiol* **42**: pp 5681-5688.
- Jiang SM, Wang L et Reeves P R (2001) Molecular Characterization of *Streptococcus pneumoniae* Type 4, 6B, 8, and 18C Capsular Polysaccharide Gene Clusters. *Infect Immun* **69**: pp 1244-1255.
- Jones C (1985) Identification of the Tetrasaccharide Repeating-Unit of the *Streptococcus pneumoniae* Type 23 Polysaccharide by High-Field Proton NMR Spectroscopy. *Carbohydr Res* **139**: pp 75-83.
- Jones C, Whitley C et Lemercinier X (2000) Full Assignment of the Proton and Carbon NMR Spectra and Revised Structure for the Capsular Polysaccharide From *Streptococcus pneumoniae* Type 17F. *Carbohydr Res* **325**: pp 192-201.
- Jones JKM et Perry M B (1957) The Structure of the Type VIII Pneumococcus Specific Polysaccharide. *J Am Chem Soc* **79**: pp 2787-2793.
- Kalin M, Kanclerski K, Granstrom M et Mollby R (1987) Diagnosis of Pneumococcal Pneumonia by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of Antibodies to Pneumococcal Hemolysin (Pneumolysin). *J Clin Microbiol* **25**: pp 226-229.
- Karlin S, Theriot J et Mrazek J (2004) Comparative Analysis of Gene Expression Among Low G+C Gram-Positive Genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: pp 6182-6187.
- Karlsson C, Jansson P E et Skov Sorensen U B (1999) The Pneumococcal Common Antigen C-Polysaccharide Occurs in Different Forms. Mono-Substituted or Di-Substituted With Phosphocholine. *Eur J Biochem* **265**: pp 1091-1097.
- Katzenellenbogen E et Jennings H J (1983) Structural Determination of the Capsular Polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* Type 19A (57). *Carbohydr Res* **124**: pp 235-245.

- Kaufman GE et Yother J (2007) CcpA-Dependent and -Independent Control of Beta-Galactosidase Expression in *Streptococcus pneumoniae* Occurs Via Regulation of an Upstream Phosphotransferase System-Encoding Operon. *J Bacteriol* **189**: pp 5183-5192.
- Keenleyside WJ et Whitfield C (1996) A Novel Pathway for O-Polysaccharide Biosynthesis in *Salmonella enterica* Serovar Borreze. *J Biol Chem* **271**: pp 28581-28592.
- Kelly T, Dillard J P et Yother J (1994) Effect of Genetic Switching of Capsular Type on Virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **62**: pp 1813-1819.
- Kenne L, Lindberg B et Madden J K (1979) Structural Studies of the Capsular Antigen From *Streptococcus pneumoniae* Type 26. *Carbohydr Res* **73**: pp 175-182.
- Kennedy DA, Buchanan J G et Baddiley J (1969) The Type-Specific Substance From Pneumococcus Type 11A(43). *Biochem J* **115**: pp 37-45.
- Kharat AS et Tomasz A (2003) Inactivation of the SrtA Gene Affects Localization of Surface Proteins and Decreases Adhesion of *Streptococcus pneumoniae* to Human Pharyngeal Cells in Vitro. *Infect Immun* **71**: pp 2758-2765.
- Kharat AS et Tomasz A (2006) Drastic Reduction in the Virulence of *Streptococcus pneumoniae* Expressing Type 2 Capsular Polysaccharide but Lacking Choline Residues in the Cell Wall. *Mol Microbiol* **60**: pp 93-107.
- Kilstrup M et Martinussen J (1998) A Transcriptional Activator, Homologous to the *Bacillus subtilis* PurR Repressor is Required for Expression of Purine Biosynthetic Genes in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* **180**: pp 3907-3916.
- Kim JO, Romero-Steiner S, Sorensen U B, Blom J, Carvalho M, Barnard S, Carlone G et Weiser J N (1999) Relationship Between Cell Surface Carbohydrates and Intrastrain Variation on Opsonophagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **67**: pp 2327-2333.
- Kim JO et Weiser J N (1998) Association of Intrastrain Phase Variation in Quantity of Capsular Polysaccharide and Teichoic Acid With the Virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* **177**: pp 368-377.
- Kloosterman TG, Hendriksen W T, Bijlsma J J, Bootsma H J, van Hijum S A, Kok J, Hermans P W et Kuipers O P (2006) Regulation of Glutamine and Glutamate Metabolism by GlnR et GlnA in *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem* **281**: pp 25097-25109.
- Konings W.N., Poolman B., Driessen A.J.M., Smid E.J., Molenaar D. (1994) Mécanismes du transport des nutriments dans les bactéries lactiques. Dans : Bactéries lactiques, Vol. I, p 209-238 (Editeurs : De Roissart H., Luquet F.M.) Lorica, Uriage, France.

- Lalioui L, Pellegrini E, Dramsi S, Baptista M, Bourgeois N, Doucet-Populaire F, Rusniok C, Zouine M, Glaser P, Kunst F, Poyart C et Trieu-Cuot P (2005) The SrtA Sortase of *Streptococcus agalactiae* is Required for Cell Wall Anchoring of Proteins Containing the LPXTG Motif, for Adhesion to Epithelial Cells, and for Colonization of the Mouse Intestine. *Infect Immun* **73**: pp 3342-3350.
- Lange R, Wagner C, de Saizieu A, Flint N, Molnos J, Stieger M, Caspers P, Kamber M, Keck W et Amrein K E (1999) Domain Organization et Molecular Characterization of 13 Two-Component Systems Identified by Genome Sequencing of *Streptococcus pneumoniae*. *Gene* **237**: pp 223-234.
- Le Bloas P. (1993) Growth Inhibition and Pyruvate Overflow During Glucose Metabolism of *Eubacterium limosum* Are Related to a Limited Capacity to Reassimilate CO₂ by the Acyl-CoA Pathway. *J Gen Microbiol*.
- Lee CJ, Lee L H, Lu C S et Wu A (2001) Bacterial Polysaccharides as Vaccines--Immunity and Chemical Characterization. *Adv Exp Med Biol* **491**: pp 453-471.
- Lee MS et Morrison D A (1999) Identification of a New Regulator in *Streptococcus pneumoniae* Linking Quorum Sensing to Competence for Genetic Transformation. *J Bacteriol* **181**: pp 5004-5016.
- Leontein K, Lindberg B, Lonngren J et Carlo D J (1983) Structural Studies of the Capsular Polysaccharide From *Streptococcus pneumoniae* Type 12A. *Carbohydr Res* **114**: pp 257-266.
- Letisse F et Lindley N D (2000) An Intracellular Metabolite Quantification Technique Applicable to Polysaccharide-Producing Bacteria. *Biotechnology Letters*.
- Lindberg B, Lonngren J et Powell D A (1977) Structural Studies on the Specific Type-14 Pneumococcal Polysaccharide. *Carbohydr Res* **58**: pp 177-186.
- Livak KJ et Schmittgen T D (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: pp 402-408.
- Llanos RM, Harris C J, Hillier A J et Davidson B E (1993) Identification of a Novel Operon in *Lactococcus lactis* Encoding Three Enzymes for Lactic Acid Synthesis: Phosphofructokinase, Pyruvate Kinase, and Lactate Dehydrogenase. *J Bacteriol* **175**: pp 2541-2551.
- Llull D, Garcia E et Lopez R (2001) Tts, a Processive Beta-Glucosyltransferase of *Streptococcus pneumoniae*, Directs the Synthesis of the Branched Type 37 Capsular Polysaccharide in Pneumococcus and Other Gram-Positive Species. *J Biol Chem* **276**: pp 21053-21061.
- Llull D, Munoz R, Lopez R et Garcia E (1999) A Single Gene (Tts) Located Outside the Cap Locus Directs the Formation of *Streptococcus pneumoniae* Type 37 Capsular Polysaccharide. Type 37 Pneumococci Are Natural, Genetically Binary Strains. *J Exp Med* **190**: pp 241-251.

- Lopez R (2006) Pneumococcus: the Sugar-Coated Bacteria. *Int Microbiol* **9**: pp 179-190.
- Ludwig H, Rebhan N, Blencke H M, Merzbacher M et Stulke J (2002) Control of the Glycolytic GapA Operon by the Catabolite Control Protein A in *Bacillus subtilis*: a Novel Mechanism of CcpA-Mediated Regulation. *Mol Microbiol* **45**: pp 543-553.
- Luesink EJ, Beumer C M, Kuipers O P et De Vos W M (1999) Molecular Characterization of the *Lactococcus lactis* PtsHI Operon and Analysis of the Regulatory Role of HPr. *J Bacteriol* **181**: pp 764-771.
- Luesink EJ, Kuipers O P et De Vos W M (1998) Regulation of the Carbohydrate Metabolism in *Lactococcus lactis* and Other Lactic Acid Bacteria. *Le Lait* pp 69-76.
- Magee AD et Yother J (2001) Requirement for Capsule in Colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **69**: pp 3755-3761.
- Martin B, Prats H et Claverys J P (1985) Cloning of the HexA Mismatch-Repair Gene of *Streptococcus pneumoniae* and Identification of the Product. *Gene* **34**: pp 293-303.
- Martinussen J, Schallert J, Andersen B et Hammer K (2001) The Pyrimidine Operon PyrRBP-CarA From *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* **183**: pp 2785-2794.
- Mascher T, Zahner D, Merai M, Balmelle N, de Saizieu A B et Hakenbeck R (2003) The *Streptococcus pneumoniae* Cia Regulon: CiaR Target Sites and Transcription Profile Analysis. *J Bacteriol* **185**: pp 60-70.
- McKessar SJ et Hakenbeck R (2007) The Two-Component Regulatory System TCS08 is Involved in Cellobiose Metabolism of *Streptococcus pneumoniae* R6. *J Bacteriol* **189**: pp 1342-1350.
- Melchiorson CR, Jokumsen K V, Villadsen J, Johnsen M G, Israelsen H et Arnau J (2000) Synthesis et Posttranslational Regulation of Pyruvate Formate-Lyase in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* **182**: pp 4783-4788.
- Mitchell TJ, Alexander J E, Morgan P J et Andrew P W (1997) Molecular Analysis of Virulence Factors of *Streptococcus pneumoniae*. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* **26**: pp 62S-71S.
- Mitchell TJ, Andrew P W, Saunders F K, Smith A N et Boulnois G J (1991) Complement Activation et Antibody Binding by Pneumolysin Via a Region of the Toxin Homologous to a Human Acute-Phase Protein. *Mol Microbiol* **5**: pp 1883-1888.
- Mohedano ML, Overweg K, de la F A, Reuter M, Altabe S, Mulholland F, de Mendoza D, Lopez P et Wells J M (2005) Evidence That the Essential Response Regulator YycF in *Streptococcus pneumoniae* Modulates Expression of Fatty Acid Biosynthesis Genes and Alters Membrane Composition. *J Bacteriol* **187**: pp 2357-2367.
- Molle V, Nakaura Y, Shivers R P, Yamaguchi H, Losick R, Fujita Y et Sonenshein A L (2003) Additional Targets of the *Bacillus subtilis* Global Regulator CodY Identified by Chromatin Immunoprecipitation et Genome-Wide Transcript Analysis. *J Bacteriol* **185**: pp 1911-1922.

- Mollerach M, Lopez R et Garcia E (1998) Characterization of the GalU Gene of *Streptococcus pneumoniae* Encoding a Uridine Diphosphoglucose Pyrophosphorylase: a Gene Essential for Capsular Polysaccharide Biosynthesis. *J Exp Med* **188**: pp 2047-2056.
- Monedero V, Kuipers O P, Jamet E et Deutscher J (2001) Regulatory Functions of Serine-46-Phosphorylated HPr in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* **183**: pp 3391-3398.
- Morona JK, Miller D C, Morona R et Paton J C (2004) The Effect That Mutations in the Conserved Capsular Polysaccharide Biosynthesis Genes CpsA, CpsB, et CpsD Have on Virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* **189**: pp 1905-1913.
- Morona JK, Morona R, Miller D C et Paton J C (2003) 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* **185**: pp 3009-3019.
- Morona JK, Paton J C, Miller D C et Morona R (2000) Tyrosine Phosphorylation of CpsD Negatively Regulates Capsular Polysaccharide Biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **35**: pp 1431-1442.
- Mosser JL et Tomasz A (1970) Choline-Containing Teichoic Acid As a Structural Component of Pneumococcal Cell Wall and Its Role in Sensitivity to Lysis by an Autolytic Enzyme. *J Biol Chem* **245**: pp 287-298.
- Musher DM (1992) Infections Caused by *Streptococcus pneumoniae*: Clinical Spectrum, Pathogenesis, Immunity, and Treatment. *Clin Infect Dis* **14**: pp 801-807.
- Oggioni MR et Claverys J P (1999) Repeated Extragenic Sequences in Prokaryotic Genomes: a Proposal for the Origin et Dynamics of the RUP Element in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* **145 (Pt 10)**: pp 2647-2653.
- Orihuela CJ, Gao G, Francis K P, Yu J et Tuomanen E I (2004) Tissue-Specific Contributions of Pneumococcal Virulence Factors to Pathogenesis. *J Infect Dis* **190**: pp 1661-1669.
- Paterson GK, Blue C E et Mitchell T J (2006) Role of Two-Component Systems in the Virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J Med Microbiol* **55**: pp 355-363.
- Paton JC et Morona J K (2007) Pneumococcal Capsular Polysaccharides: Biosynthesis and Regulation. Dans *The Molecular Biology of Streptococci* (Hakenbeck R et Chhatwal GS eds) pp 119-136.
- Pericone CD, Overweg K, Hermans P W et Weiser J N (2000) Inhibitory and Bactericidal Effects of Hydrogen Peroxide Production by *Streptococcus pneumoniae* on Other Inhabitants of the Upper Respiratory Tract. *Infect Immun* **68**: pp 3990-3997.
- Phillips LR, Nishimura O et Fraser B A (1983) The Structure of the Repeating Oligosaccharide Unit of the Pneumococcal Capsular Polysaccharide Type 18C. *Carbohydr Res* **121**: pp 243-255.

- Poncet S, Mijakovic I, Nessler S, Gueguen-Chaignon V, Chaptal V, Galinier A, Boel G, Maze A et Deutscher J (2004) HPr Kinase/Phosphorylase, a Walker Motif A-Containing Bifunctional Sensor Enzyme Controlling Catabolite Repression in Gram-Positive Bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1697**: pp 123-135.
- Postma PW, Lengeler J W et Jacobson G R (1993) Phosphoenolpyruvate:Carbohydrate Phosphotransferase Systems of Bacteria. *Microbiol Rev* **57**: pp 543-594.
- Prudhomme M, Attaiech L, Sanchez G, Martin B et Claverys J P (2006) Antibiotic Stress Induces Genetic Transformability in the Human Pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *Science* **313**: pp 89-92.
- Prudhomme M, Camilli A et Claverys J P (2007) In vitro mariner mutagenesis of *Streptococcus pneumoniae*: tools and traps. Dans *The Molecular Biology of Streptococci* (Hakenbeck R et Chhatwal GS eds).
- Prudhomme M et Claverys J P (2007) There will be a light: the use of *luc* transcriptional fusion in living pneumococcal cells. Dans *The Molecular Biology of Streptococci* (Hakenbeck R et Chhatwal GS eds) pp 519-524.
- Rane L et Subbarow Y (1940) Nutritional Requirements of the Pneumococcus: I. Growth Factors for Types I, II, V, VII, VIII. *J Bacteriol* **40**: pp 695-704.
- Rao EV, Buchanan J G et Baddiley J (1966) The Type-Specific Substance From Pneumococcus Type 10A(34). Structure of the Dephosphorylated Repeating Unit. *Biochem J* **100**: pp 801-810.
- Reeves RE et Goebel W F (1941) Chemoimmunological Studies on the Soluble Specific Substance of Pneumococcus: the Structure of the Type 3 Polysaccharide. *J Biol Chem* **139**: pp 511-519.
- Richards JC et Perry M B (1988) Structure of the Specific Capsular Polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* Type 23F (American Type 23). *Biochem Cell Biol* **66**: pp 758-771.
- Richards JC, Perry M B et Kniskern P J (1984) The Specific Capsular Polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* Type 33F. *Can J Biochem Cell Biol* **62**: pp 666-677.
- Ring A, Weiser J N et Tuomanen E I (1998) Pneumococcal Trafficking Across the Blood-Brain Barrier. Molecular Analysis of a Novel Bidirectional Pathway. *J Clin Invest* **102**: pp 347-360.
- Rosenow C, Ryan P, Weiser J N, Johnson S, Fontan P, Ortqvist A et Masure H R (1997) Contribution of Novel Choline-Binding Proteins to Adherence, Colonization and Immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **25**: pp 819-829.
- Rotimi VO et Duerden B I (1981) The Development of the Bacterial Flora in Normal Neonates. *J Med Microbiol* **14**: pp 51-62.

- Rutherford TJ, Jones C, Davies D B et Elliott A C (1991) Location and Quantitation of the Sites of O-Acetylation on the Capsular Polysaccharide From *Streptococcus pneumoniae* Type 9V by ¹H-NMR Spectroscopy: Comparison With Type 9A. *Carbohydr Res* **218**: pp 175-184.
- Sahoo, A. Vaccines: The World Market. 2007. Rapport, *Kalorama information*.
- Saier MH, Jr., Chauvaux S, Cook G M, Deutscher J, Paulsen I T, Reizer J et Ye J J (1996) Catabolite Repression and Inducer Control in Gram-Positive Bacteria. *Microbiology* **142 (Pt 2)**: pp 217-230.
- Sambrook J, Fritsch E F et Maniatis T (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual (Second Edition)*. Cold Spring Harbor, New York.
- Sanchez-Puelles JM, Ronda C, Garcia J L, Garcia P, Lopez R et Garcia E (1986) Searching for Autolysin Functions. Characterization of a Pneumococcal Mutant Deleted in the LytA Gene. *Eur J Biochem* **158**: pp 289-293.
- Sandgren A, Albiger B, Orihuela C J, Tuomanen E, Normark S et Henriques-Normark B (2005) Virulence in Mice of Pneumococcal Clonal Types with Known Invasive Disease Potential in Humans. *J Infect Dis* **192**: pp 791-800.
- Sandgren A, Sjostrom K, Olsson-Liljequist B, Christensson B, Samuelsson A, Kronvall G et Henriques N B (2004) Effect of Clonal and Serotype-Specific Properties on the Invasive Capacity of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* **189**: pp 785-796.
- Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M et Ragg T (2006) The RIN: an RNA Integrity Number for Assigning Integrity Values to RNA Measurements. *BMC Mol Biol* **7**: pp 3.
- Schumacher MA, Allen G S, Diel M, Seidel G, Hillen W et Brennan R G (2004) Structural Basis for Allosteric Control of the Transcription Regulator CcpA by the Phosphoprotein HPr-Ser46-P. *Cell* **118**: pp 731-741.
- Schumacher MA, Seidel G, Hillen W et Brennan R G (2007) Structural Mechanism for the Fine-Tuning of CcpA Function by the Small Molecule Effectors Glucose 6-Phosphate et Fructose 1,6-Bisphosphate. *J Mol Biol* **368**: pp 1042-1050.
- Serrano I, Melo-Cristino J et Ramirez M (2006) Heterogeneity of Pneumococcal Phase Variants in Invasive Human Infections. *BMC Microbiol* **6**: pp 67.
- Serror P et Sonenshein A L (1996) CodY is Required for Nutritional Repression of *Bacillus subtilis* Genetic Competence. *J Bacteriol* **178**: pp 5910-5915.
- Shivers RP, Dineen S S et Sonenshein A L (2006) Positive Regulation of *Bacillus subtilis* AckA by CodY and CcpA: Establishing a Potential Hierarchy in Carbon Flow. *Mol Microbiol* **62**: pp 811-822.

- Skovsted IC, Kerrn M B, Sonne-Hansen J, Sauer L E, Nielsen A K, Konradsen H B, Petersen B O, Nyberg N T et Duus J O (2007) Purification and Structure Characterization of the Active Component in the Pneumococcal 22F Polysaccharide Capsule Used for Adsorption in Pneumococcal Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Vaccine* **25**: pp 6490-6500.
- Snoep JL, Teixeira de Mattos M J, Starrenburg M J et Hugenholtz J (1992) Isolation, Characterization, and Physiological Role of the Pyruvate Dehydrogenase Complex and Alpha-Acetolactate Synthase of *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* bv. *Diacetylactis*. *J Bacteriol* **174**: pp 4838-4841.
- Sorensen CH, Andersen L P, Tos M, Thomsen J et Holm-Jensen S (1988) Nasopharyngeal Bacteriology and Secretory Otitis Media in Young Children. *Acta Otolaryngol* **105**: pp 126-131.
- Sorensen UB et Henrichsen J (1987) Cross-Reactions Between Pneumococci and Other Streptococci due to C Polysaccharide et F Antigen. *J Clin Microbiol* **25**: pp 1854-1859.
- Sorensen UB, Henrichsen J, Chen H C et Szu S C (1990) Covalent Linkage Between the Capsular Polysaccharide and the Cell Wall Peptidoglycan of *Streptococcus pneumoniae* Revealed by Immunochemical Methods. *Microb Pathog* **8**: pp 325-334.
- Spratt BG et Greenwood B M (2000) Prevention of Pneumococcal Disease by Vaccination: Does Serotype Replacement Matter? *Lancet* **356**: pp 1210-1211.
- Standish AJ, Stroehler U H et Paton J C (2005) The Two-Component Signal Transduction System RR06/HK06 Regulates Expression of CbpA in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: pp 7701-7706.
- Standish AJ, Stroehler U H et Paton J C (2007) The Pneumococcal Two-Component Signal Transduction System RR/HK06 Regulates CbpA et PspA by Two Distinct Mechanisms. *J Bacteriol* **189**: pp 5591-5600.
- Steinmoen H, Knutsen E et Havarstein L S (2002) Induction of Natural Competence in *Streptococcus pneumoniae* Triggers Lysis and DNA Release From a Subfraction of the Cell Population. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: pp 7681-7686.
- Stern A et Meyer T F (1987) Common Mechanism Controlling Phase and Antigenic Variation in Pathogenic Neisseriae. *Mol Microbiol* **1**: pp 5-12.
- Stock AM, Robinson V L et Goudreau P N (2000) Two-Component Signal Transduction. *Annu Rev Biochem* **69**: pp 183-215.
- Stroehler, U. H. et Paton, J. C. Genetic analysis of pneumococcal colony opacity phase variation. 2007. *Europneumo 2007*, Oeiras, Portugal. Communication personnelle.
- Stroop CJ, Xu Q, Retzlaff M, Abeygunawardana C et Bush C A (2002) Structural Analysis et Chemical Depolymerization of the Capsular Polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* Type 1. *Carbohydr Res* **337**: pp 335-344.

- Stulke J et Hillen W (2000) Regulation of Carbon Catabolism in *Bacillus* Species. *Annu Rev Microbiol* **54**: pp 849-880.
- Sugawara T et Igarashi K (1988) Synthesis of a Trisaccharide Component of the Capsular Polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* Type 19F. *Carbohydr Res* **172**: pp 195-207.
- Talaga P, Bellamy L et Moreau M (2001) Quantitative Determination of C-Polysaccharide in *Streptococcus pneumoniae* Capsular Polysaccharides by Use of High-Performance Anion-Exchange Chromatography With Pulsed Amperometric Detection. *Vaccine* **19**: pp 2987-2994.
- Talaga P, Vialle S et Moreau M (2002) Development of a High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed-Amperometric Detection Based Quantification Assay for Pneumococcal Polysaccharides and Conjugates. *Vaccine* **20**: pp 2474-2484.
- Tettelin H, Nelson K E, Paulsen I T, Eisen J A, Read T D, Peterson S, Heidelberg J, DeBoy R T, Haft D H, Dodson R J, Durkin A S, Gwinn M, Kolonay J F, Nelson W C, Peterson J D, Umayam L A, White O, Salzberg S L, Lewis M R, Radune D, Holtzapple E, Khouri H, Wolf A M, Utterback T R, Hansen C L, McDonald L A, Feldblyum T V, Angiuoli S, Dickinson T, Hickey E K, Holt I E, Loftus B J, Yang F, Smith H O, Venter J C, Dougherty B A, Morrison D A, Hollingshead S K et Fraser C M (2001) Complete Genome Sequence of a Virulent Isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* **293**: pp 498-506.
- Thompson J. G-WCR (1994) Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. Dans *Bactéries Lactiques* (De Roissart H. LFM ed) pp 239-290, Lorica, Uriage, France.
- Thompson J, Turner K W et Thomas T D (1978) Catabolite Inhibition and Sequential Metabolism of Sugars by *Streptococcus lactis*. *J Bacteriol* **133**: pp 1163-1174.
- Tojo S, Satomura T, Morisaki K, Deutscher J, Hirooka K et Fujita Y (2005) Elaborate Transcription Regulation of the *Bacillus subtilis* Ilv-Leu Operon Involved in the Biosynthesis of Branched-Chain Amino Acids Through Global Regulators of CcpA, CodY et TnrA. *Mol Microbiol* **56**: pp 1560-1573.
- Tomasz A (1967) Choline in the Cell Wall of a Bacterium: Novel Type of Polymer-Linked Choline in Pneumococcus. *Science* **157**: pp 694-697.
- Tong HH, Blue L E, James M A et DeMaria T F (2000) Evaluation of the Virulence of a *Streptococcus pneumoniae* Neuraminidase-Deficient Mutant in Nasopharyngeal Colonization and Development of Otitis Media in the Chinchilla Model. *Infect Immun* **68**: pp 921-924.
- Tu AH, Fulgham R L, McCrory M A, Briles D E et Szalai A J (1999) Pneumococcal Surface Protein A Inhibits Complement Activation by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **67**: pp 4720-4724.

- Tuomanen E, Liu H, Hengstler B, Zak O et Tomasz A (1985a) The Induction of Meningeal Inflammation by Components of the Pneumococcal Cell Wall. *J Infect Dis* **151**: pp 859-868.
- Tuomanen E, Tomasz A, Hengstler B et Zak O (1985b) The Relative Role of Bacterial Cell Wall and Capsule in the Induction of Inflammation in Pneumococcal Meningitis. *J Infect Dis* **151**: pp 535-540.
- Viana, R., V. Monedero, V. Dossonnet, C. Vadeboncoeur, G. Perez-Martinez, and J. Deutscher. 2000. Enzyme I and HPr from *Lactobacillus casei*: their role in sugar transport, carbon catabolite repression and inducer exclusion. *Mol Microbiol* **36**: pp 570–584
- Veenhoven R, Bogaert D, Uiterwaal C, Brouwer C, Kiezebrink H, Bruin J, IJzerman E, Hermans P, de Groot R, Zegers B, Kuis W, Rijkers G, Schilder A et Sanders E (2003) Effect of Conjugate Pneumococcal Vaccine Followed by Polysaccharide Pneumococcal Vaccine on Recurrent Acute Otitis Media: a Randomised Study. *Lancet* **361**: pp 2189-2195.
- Ventura CL, Cartee R T, Forsee W T et Yother J (2006) Control of Capsular Polysaccharide Chain Length by UDP-Sugar Substrate Concentrations in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **61**: pp 723-733.
- Vollmer W et Tomasz A (2001) Identification of the Teichoic Acid Phosphorylcholine Esterase in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **39**: pp 1610-1622.
- Waite RD, Struthers J K et Dowson C G (2001) Spontaneous Sequence Duplication Within an Open Reading Frame of the Pneumococcal Type 3 Capsule Locus Causes High-Frequency Phase Variation. *Mol Microbiol* **42**: pp 1223-1232.
- Weickert MJ et Chambliss G H (1990) Site-Directed Mutagenesis of a Catabolite Repression Operator Sequence in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: pp 6238-6242.
- Weiser JN, Austrian R, Sreenivasan P K et Masure H R (1994) Phase Variation in Pneumococcal Opacity: Relationship Between Colonial Morphology et Nasopharyngeal Colonization. *Infect Immun* **62**: pp 2582-2589.
- Weiser JN, Bae D, Epino H, Gordon S B, Kapoor M, Zenewicz L A et Shchepetov M (2001) Changes in Availability of Oxygen Accentuate Differences in Capsular Polysaccharide Expression by Phenotypic Variants and Clinical Isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **69**: pp 5430-5439.
- Weiser JN, Pan N, McGowan K L, Musher D, Martin A et Richards J (1998) Phosphorylcholine on the Lipopolysaccharide of *Haemophilus Influenzae* Contributes to Persistence in the Respiratory Tract and Sensitivity to Serum Killing Mediated by C-Reactive Protein. *J Exp Med* **187**: pp 631-640.
- Weiser JN, Shchepetov M et Chong S T (1997) Decoration of Lipopolysaccharide With Phosphorylcholine: a Phase-Variable Characteristic of *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **65**: pp 943-950.

- Wray LV, Jr., Ferson A E et Fisher S H (1997) Expression of the *Bacillus subtilis* UreABC Operon is Controlled by Multiple Regulatory Factors Including CodY, GlnR, TnrA, and Spo0H. *J Bacteriol* **179**: pp 5494-5501.
- Yother J, Leopold K, White J et Fischer W (1998) Generation et Properties of a *Streptococcus pneumoniae* Mutant Which Does Not Require Choline or Analogs for Growth. *J Bacteriol* **180**: pp 2093-2101.
- Zahner D et Hakenbeck R (2000) The *Streptococcus pneumoniae* Beta-Galactosidase is a Surface Protein. *J Bacteriol* **182**: pp 5919-5921.
- Zeisel SH (2000) Choline: an Essential Nutrient for Humans. *Nutrition* **16**: pp 669-671.
- Zhang JR, Idanpaan-Heikkila I, Fischer W et Tuomanen E I (1999) Pneumococcal *licD2* Gene Is Involved in Phosphorylcholine Metabolism. *Mol Microbiol* **31**: pp 1477-1488.
- Zomer AL, Buist G, Larsen R, Kok J et Kuipers O P (2007) Time-Resolved Determination of the CcpA Regulon of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *J Bacteriol* **189**: pp 1366-1381.
- Zwijnenburg PJ, van der P T, Florquin S, van Deventer S J, Roord J J et van Furth A M (2001) Experimental Pneumococcal Meningitis in Mice: a Model of Intranasal Infection. *J Infect Dis* **183**: pp 1143-1146.

Publications et communications

PUBLICATIONS

✓ Pendant la thèse

Storai J, Planard, MF, et Lindley, ND. Improvement of Pneumococcal polysaccharide yield in Pneumo 23 fermentation process. Sanofi-Pasteur. *Demande de dépôt du brevet en Octobre 2007 par Sanofi-Pasteur.*

Storai J, Martin B, Granadel C, Claverys J-P, Planard M-F, Lindley N.D: Positive control by CcpA-FDP of two key determinants of *Streptococcus pneumoniae* virulence, choline utilization et capsule production. *En préparation.*

✓ Avant la thèse

Blondin B, Rossignol T, Storai J et Postaire O (2005) Global Analysis of Gene Expression of the Wine Yeast EC1118 During Rehydration et Following Inoculation. *Yeast* **22b**: pp 37-51.

Rossignol T, Postaire O, Storai J et Blondin B (2006) Analysis of the Genomic Response of a Wine Yeast to Rehydration et Inoculation. *Appl Microbiol Biotechnol* **71**: pp 699-712.

COMMUNICATIONS ORALES

Storai J, Martin B, Claverys J-P, Planard M-F, Lindley N.D: A common regulatory mechanism couples both capsule synthesis et choline utilization to glycolysis in *S. pneumoniae*. Europneumo, Oeiras (Portugal), April 14-17, 2007.

Storai J, Martin B, Claverys J-P, Planard M-F, Lindley N.D: Etude métabolique et transcriptomique de *S. pneumoniae* en lien avec la production de polysaccharide capsulaire. Microbiotoul, Toulouse (France), April 18-19, 2007.

Annexes

Annexe 1a. Comparaison des niveaux d'expression de gènes d'intérêts obtenus entre le sérotype 4 et le sérotype 5 à 3 h (phase exponentielle) puis à 6 h de culture (phase stationnaire). Les zones encadrées correspondent à des gènes divergents partageant potentiellement un même promoteur.

Opéron	Gène	Fonction(s)	Type 4/Type 5 Phase expo. (3 h)	Type 5/Type 4 Phase stat. (6 h)
<i>cps</i>	Synthèse capsulaire			
	<i>cpsA</i>	Activateur transcriptionnel	2.4	ND ^a
	<i>cpsB</i>	P-tyrosine phosphatase	2.9	1.6
	<i>cpsC</i>	Attachement du CPS à la paroi	6	2.6
	<i>cpsD</i>	Polymérisation et export (avec CpsC); Tyrosine kinase	2.7	1.5
	<i>cpsE</i>	Transférase	6.9	2.1
	<i>cpsF</i>	Glycosyl transférase	5.6	1.9
<i>lic1</i>	Assimilation et utilisation de la choline			
	<i>spr1148</i>	CDP-ribitol pyrophosphorylase	10.5	2.9
	<i>spr1149</i>	Alcool déshydrogénase	7.8	1.6
	<i>licA</i>	Choline kinase	15.7	3.4
	<i>licB</i>	Transporteur de choline	4.3	ND
	<i>licC</i>	P-Choline cytidylyltransférase	9.1	1.7
<i>ilvBNC-A</i>	Synthèse des acides aminés branchés			
	<i>ilvB</i>	Acétolactate synthase	ND	1.6
	<i>ilvN</i>	Acétolactate synthase	1.6	1.7
	<i>ilvC</i>	Ketol-acid reductoisomérase	1.8	ND
	<i>ilvA</i>	Threonine déhydratase	1.5	1.5
<i>livJHMGF</i>	Transport des acides aminés branchés			
	<i>livJ</i>	Substrat-binding protein	ND	1.7
	<i>livH</i>	Protéine membranaire	1.6	2.3
	<i>livM</i>	Protéine membranaire	1.5	1.8
	<i>livG</i>	ATP-binding protein	1.7	1.6
	<i>livF</i>	ATP-binding protein	ND	ND
Glycolyse	Métabolisme énergétique			
	<i>ackA</i>	Acetate kinase	1.5	ND
	<i>eno</i>	Enolase	ND	2.1
	<i>fba</i>	Fructose-bisphosphate aldolase	ND	1.5
<i>ldh</i> ← → <i>gyrA</i>				
	<i>ldh</i>	Lactate deshydrogénase	2	2.7
	<i>gyrA</i>	DNA gyrase (sous unité A)	1.8	2.3
	<i>srtA</i>	Sortase	2.1	1.7

Annexe 1b. Comparaison des niveaux d'expression de gènes d'intérêts obtenus entre le sérotype 4 et le sérotype 5 à 3 h (phase exponentielle) puis à 6 h de culture (phase stationnaire). Les zones encadrées correspondent à des gènes divergents partageant potentiellement un même promoteur.

Opéron	Gène	Fonction(s)	Type 4/Type 5 Phase expo. (3 h)	Type 5/Type 4 Phase stat. (6 h)
Glycolyse		Métabolisme énergétique		
	<i>pfkA</i>	P-fructokinase	1.6	1.7
	<i>pykF</i>	Pyruvate kinase	ND	ND
<i>tpi-lytC</i>				
	<i>tpi</i>	Triose phosphate isomérase	1.6	1.7
	<i>lytC</i>	1,4-beta-N-acetylmuramidase	2	1.6
<i>ptsHI</i>				
	<i>ptsH</i>	HPr	ND	1.6
	<i>ptsI</i>	PEP-protéine P-transférase	2.1	1.5
Sucres alternatifs		Métabolisme énergétique		
<i>glgBCDA</i>				
	<i>glgB</i>	Enzyme branchante	0.5	0.7
	<i>glgC</i>	Glucose-1-phosphate adenylyltransférase	0.5	0.7
	<i>glgD</i>	Glucose-1-phosphate adenylyltransférase	0.6	0.7
	<i>glgA</i>	Glycogène synthase	0.6	0.6
<i>galKT</i> ↔ <i>galR</i>				
	<i>galR</i>	Galactose repressor	0.5	ND
<i>galKT</i>				
	<i>galK</i>	Galactokinase	0.7	0.7
	<i>galT</i>	Galactose-1-phosphate uridylyltransférase	0.6	0.7
<i>ptsEII-bgaA</i>				
	<i>ptsEII</i>	<i>spr0562</i> ; PTS system EII component	0.6	0.6
	<i>spr0563</i>	Protéine hypothétique	0.6	0.6
	<i>ptsEII</i>	<i>spr0564</i> ; PTS system EII component	0.7	0.7
	<i>bgaA</i>	β-galactosidase de surface (adhésion)	0.5	0.7
Régulateurs				
	<i>ccpA</i>	Catabolite control protein A	ND	1.6
	<i>codY</i>	Répresseur transcriptionnel	ND	0.7
<i>pepN-ciaRH</i>				
	<i>pepN</i>	Aminopeptidase N	ND	ND
	<i>ciaR</i>	DNA-binding response regulator	3	ND
	<i>ciaH</i>	Sensor protein histidine kinase	1.9	ND
Autres				
	<i>cbpE</i>	CbpE; P-Cho esterase	2	1.8
	<i>cbpG</i>	CbpG; adhérence	2.9	1.6
	<i>nox</i>	NADH oxidase	ND	1.6
	<i>spr0583</i>	Putative pneumococcal surface protein	0.54	0.71

^a: pas de variation significative entre les deux souches.

Annexe 2. Données de fermentation concernant les essais à l'échelle 5 l en conditions standards. Ces données sont moyennées pour 4 essais de fermentation indépendants.

Sérotype	Temps (h)	DO _{694nm}	Masse sèche (g/l)	Glucose (g/l)	Lactate (g/l)	Formiate (g/l)	Acétate (g/l)	Ethanol (g/l)	CPS (g/l)	TA/LTA (g/l)
Sérotype 4	0,330	0,065	0,036	12,300	0,116	0,000	0,000	0,000	0,072	0,004
	1,000	0,148	0,081	11,400	0,262	0,000	0,000	0,000	0,080	0,005
	2,000	0,504	0,277	10,200	1,030	0,115	0,000	0,000	0,109	0,014
	3,000	1,670	0,919	8,540	3,440	0,295	0,000	0,113	0,173	0,026
	4,000	2,490	1,370	6,270	5,470	0,288	0,148	0,121	0,168	0,036
	5,000	2,710	1,516	3,610	7,410	0,491	0,299	0,186	0,161	0,047
	6,000	2,670	1,469	1,010	9,350	0,719	0,478	0,228	0,158	0,049
	7,000	2,620	1,441	0,180	10,700	0,793	0,569	0,287	0,147	0,051
	8,000	2,560	1,408	0,110	10,700	0,820	0,630	0,300	0,134	0,050
	13,000	1,530	0,842	0,030	11,100	0,410	0,270	0,180	0,108	0,050
Sérotype 5	0,330	0,140	0,077	12,610	0,306	0,000	0,000	0,000	0,001	0,009
	1,000	0,234	0,229	12,100	0,478	0,000	0,000	0,000	0,003	0,013
	2,000	0,598	0,429	9,940	1,330	0,110	0,000	0,000	0,005	0,021
	3,000	1,580	0,969	7,860	3,420	0,270	0,000	0,097	0,011	0,031
	4,000	2,370	1,404	4,990	5,170	0,568	0,290	0,236	0,037	0,043
	5,000	2,770	1,624	3,280	6,610	0,950	0,546	0,416	0,040	0,051
	6,000	2,810	1,716	1,990	7,220	1,284	0,762	0,545	0,041	0,056
	7,000	2,740	1,607	1,440	7,660	1,590	0,976	0,668	0,042	0,062
	8,000	2,730	1,602	1,260	7,710	1,810	1,230	0,710	0,042	0,066
	13,000	2,330	1,352	0,070	7,390	1,050	0,550	0,440	0,042	0,073
Sérotype 8	0,330	0,070	0,039	12,600	0,123	0,000	0,000	0,000	0,084	0,004
	1,000	0,158	0,087	11,900	0,256	0,000	0,000	0,000	0,050	0,007
	2,000	0,510	0,281	11,200	0,710	0,123	0,000	0,000	0,076	0,019
	3,000	1,390	0,765	8,980	2,330	0,280	0,228	0,149	0,095	0,031
	4,000	3,580	1,969	4,060	6,020	0,627	0,322	0,334	0,145	0,056
	5,000	4,590	2,514	0,230	8,620	1,046	0,598	0,513	0,204	0,074
	6,000	4,320	2,376	0,120	8,810	1,082	0,581	0,560	0,217	0,076
	7,000	4,080	2,244	0,100	9,210	1,093	0,651	0,568	0,207	0,074
	8,000	3,970	2,184	0,060	9,230	1,130	0,700	0,580	0,201	0,076
	13,000	3,240	1,782	0,010	8,850	0,500	0,350	0,240	0,193	0,077
Sérotype 20	0,330	0,080	0,044	12,600	0,134	0,000	0,000	0,000	0,073	0,006
	1,000	0,191	0,105	11,800	0,358	0,000	0,000	0,000	0,092	0,011
	2,000	0,760	0,418	10,500	1,770	0,096	0,000	0,000	0,117	0,020
	3,000	3,060	1,683	5,330	5,850	0,294	0,187	0,141	0,169	0,031
	4,000	3,890	2,144	1,730	7,900	0,875	0,492	0,426	0,162	0,039
	5,000	3,510	1,931	0,100	8,480	1,190	0,715	0,610	0,146	0,045
	6,000	3,170	1,744	0,080	8,510	1,299	0,782	0,627	0,137	0,047
	7,000	2,890	1,590	0,020	8,740	1,272	0,799	0,615	0,132	0,049
	8,000	2,760	1,518	0,010	8,910	1,300	0,880	0,620	0,127	0,051
	13,000	0,940	0,517	0,010	8,400	0,530	0,320	0,230	0,117	0,050
Sérotype 33F	0,330	0,119	0,065	12,520	0,214	0,000	0,000	0,000	0,014	0,004
	1,000	0,229	0,126	11,520	0,428	0,000	0,000	0,000	0,058	0,009
	2,000	0,603	0,332	9,920	1,316	0,086	0,000	0,000	0,112	0,023
	3,000	1,910	1,051	7,180	3,840	0,187	0,000	0,000	0,209	0,041
	4,000	3,220	1,771	3,820	7,540	0,403	0,213	0,160	0,237	0,056
	5,000	3,510	1,909	0,420	9,550	0,744	0,458	0,288	0,242	0,065
	6,000	3,290	1,810	0,110	9,820	0,872	0,556	0,336	0,245	0,067
	7,000	2,990	1,645	0,090	9,950	0,898	0,589	0,362	0,238	0,066
	8,000	2,860	1,573	0,060	9,970	0,880	0,620	0,350	0,227	0,066
	13,000	1,870	1,029	0,000	9,870	0,510	0,260	0,210	0,117	0,067

Annexe 3. Données de fermentation concernant les essais à l'échelle 5 l en conditions choline+. Ces données sont moyennées pour 4 essais de fermentation indépendants.

Sérotype	Temps (h)	DO _{694nm}	Masse sèche (g/l)	Glucose (g/l)	Lactate (g/l)	Formiate (g/l)	Acétate (g/l)	Ethanol (g/l)	CPS (g/l)	TA/LTA (g/l)
Sérotype 4	0,330	0,053	0,029	30,240	0,164	0,000	0,000	0,000	0,083	0,000
	1,000	0,102	0,056	29,471	0,282	0,000	0,000	0,000	0,089	0,000
	2,000	0,330	0,182	28,156	0,822	0,000	0,000	0,000	0,095	0,006
	3,000	1,000	0,550	25,648	2,581	0,000	0,000	0,000	0,115	0,012
	4,000	1,960	1,078	21,029	6,359	0,000	0,000	0,000	0,153	0,023
	5,000	3,660	2,013	13,471	13,452	0,387	0,000	0,080	0,322	0,054
	6,000	6,280	3,454	4,502	20,767	0,639	0,000	0,159	0,433	0,093
	7,000	6,360	3,498	0,229	23,894	0,673	0,106	0,213	0,449	0,114
	8,000	6,400	3,520	0,000	25,458	0,788	0,186	0,230	0,423	0,117
	13,000	6,120	3,366	0,000	24,917	0,975	0,290	0,250	0,421	0,120
Sérotype 5	0,330	0,065	0,039	30,247	0,153	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000
	1,000	0,126	0,075	29,504	0,302	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002
	2,000	0,301	0,180	28,692	0,783	0,000	0,000	0,000	0,002	0,006
	3,000	0,740	0,444	26,046	1,816	0,000	0,000	0,000	0,003	0,016
	4,000	1,600	0,960	24,664	4,399	0,193	0,000	0,000	0,005	0,056
	5,000	2,700	1,620	21,350	9,872	0,362	0,000	0,095	0,021	0,099
	6,000	4,360	2,616	13,142	14,191	0,460	0,000	0,126	0,054	0,133
	7,000	5,680	3,408	7,425	21,023	0,633	0,147	0,190	0,087	0,146
	8,000	5,840	3,504	2,122	23,445	0,674	0,187	0,209	0,101	0,151
	13,000	5,480	3,288	0,000	23,355	0,748	0,334	0,203	0,084	0,160
Sérotype 8	0,330	0,062	0,034	30,100	0,100	0,000	0,000	0,000	0,074	0,000
	1,000	0,130	0,072	29,900	0,260	0,000	0,000	0,000	0,100	0,000
	2,000	0,340	0,187	29,700	0,750	0,000	0,000	0,000	0,102	0,004
	3,000	1,140	0,627	25,500	2,070	0,152	0,000	0,000	0,104	0,013
	4,000	2,970	1,634	19,400	7,400	0,361	0,000	0,141	0,154	0,036
	5,000	5,000	2,750	14,000	14,300	0,488	0,184	0,223	0,208	0,061
	6,000	7,360	4,048	2,260	19,700	0,741	0,291	0,331	0,328	0,087
	7,000	8,100	4,455	1,400	24,600	0,911	0,345	0,356	0,423	0,093
	8,000	8,120	4,466	0,070	25,100	0,953	0,426	0,363	0,504	0,095
	13,000	7,540	4,147	0,000	24,300	1,012	0,510	0,454	0,484	0,098
Sérotype 20	0,330	0,069	0,038	30,006	0,142	0,000	0,000	0,000	0,106	0,000
	1,000	0,150	0,083	29,894	0,314	0,000	0,000	0,000	0,116	0,003
	2,000	0,520	0,286	23,573	0,907	0,000	0,000	0,000	0,136	0,009
	3,000	1,570	0,864	22,073	3,767	0,000	0,000	0,000	0,166	0,017
	4,000	4,240	2,332	15,653	11,191	0,362	0,000	0,142	0,206	0,036
	5,000	7,100	3,905	4,145	22,619	0,708	0,217	0,297	0,259	0,069
	6,000	7,880	4,354	0,108	23,412	0,857	0,298	0,367	0,284	0,091
	7,000	7,840	4,312	0,000	23,559	0,845	0,356	0,363	0,307	0,099
	8,000	6,960	3,828	0,000	22,847	0,900	0,379	0,383	0,288	0,103
	13,000	6,480	3,564	0,000	25,165	1,100	0,573	0,449	0,270	0,106
Sérotype 33F	0,330	0,083	0,046	28,786	0,104	0,000	0,000	0,000	0,012	0,000
	1,000	0,165	0,091	28,174	0,344	0,000	0,000	0,000	0,042	0,000
	2,000	0,480	0,264	26,779	1,125	0,000	0,000	0,000	0,069	0,006
	3,000	1,400	0,770	25,358	4,004	0,164	0,000	0,000	0,112	0,016
	4,000	3,540	1,947	17,399	9,887	0,375	0,000	0,160	0,332	0,038
	5,000	6,600	3,630	4,905	19,402	0,560	0,197	0,266	0,627	0,064
	6,000	7,840	4,312	0,000	23,506	0,851	0,313	0,317	0,681	0,086
	7,000	7,400	4,070	0,000	23,837	0,905	0,365	0,312	0,679	0,091
	8,000	7,170	3,944	0,000	24,647	0,978	0,466	0,348	0,679	0,093
	13,000	6,880	3,784	0,000	24,011	1,044	0,560	0,414	0,696	0,095

Annexe 4. Données de fermentation concernant les essais à l'échelle industrielle (2000 l) en conditions choline+.

Sérotype	Temps (h)	DO _{694nm}	Masse sèche (g/l)	Glucose (g/l)	Lactate (g/l)	CPS (g/l)
Sérotype 8	0,083	0,027	0,015	30,200	0,090	
	1,000	0,077	0,042	29,000	0,160	
	2,000	0,250	0,138	27,000	0,690	
	3,000	1,160	0,638	24,600	2,260	
	3,500	2,040	1,122	23,100	4,080	
	4,000	3,200	1,760	20,700	6,090	ND ^a
	4,500	4,720	2,596	15,500	9,340	
	5,083	6,400	3,520	11,000	13,500	
	5,500	7,100	3,905	7,670	16,300	
	6,000	7,200	3,960	4,930	19,600	
	6,500	6,910	3,801	1,310	21,200	
	10,000	6,770	3,724	0,000	23,000	0,46
Sérotype 33F	0,083	0,021	0,012	30,100	0,110	
	1,000	0,078	0,043	29,400	0,330	
	2,000	0,262	0,144	28,300	0,970	
	3,000	1,170	0,644	24,300	2,660	
	3,500	1,850	1,018	21,000	4,850	
	4,000	2,880	1,584	18,000	8,150	ND
	4,500	4,720	2,596	13,900	11,900	
	5,116	5,700	3,135	7,820	15,400	
	5,500	6,100	3,355	5,180	17,600	
	6,000	6,300	3,465	2,750	20,200	
	6,500	6,400	3,520	0,640	21,600	
	10,000	6,200	3,410	0,000	23,400	0,65

^a : non déterminé

Annexe 5. Positionnement des RUPA (contenant un *cre* potentiel) en amont de l'opéron *cps*, pour l'ensemble des sérotypes de *S. pneumoniae*.

Sérotypes ayant le RUPA devant l'opéron <i>cps</i> positionné de façon homologue à la souche R6*	1, 2, 4, 5, 6a, 6b, 7a, 7b, 8, 9a, 9n, 10a, 10b, 10c, 10f, 11a, 12a, 12b, 12f, 13, 15a, 15b, 15c, 15f, 16a, 16f, 17a, 17f, 18a, 18b, 18c, 18f, 19a, 19b, 19f, 21, 22a, 23a, 24b, 27, 28a, 28f, 29, 31, 33a, 33b, 33c, 33d, 34, 35a, 35b, 35c, 37, 39, 41a, 42, 43, 44, 45, 46, 47a, 47f, 48
Sérotypes ayant le RUPA positionné différemment	3, 7c, 7f, 9l, 9v, 11c, 11d, 11f, 14, 19c, 20, 22f, 23b, 23f, 24a, 24f, 25a, 25f, 32a, 32f, 33f, 35f, 36, 38, 40, 41f

* : 120 pb en amont de l'ATG

Annexe 6. Souches, plasmides et primers utilisés au cours de la thèse.

Souches	Génotype / caractéristiques	Source/référence
<i>S. pneumoniae</i>		
34348	Isolat clinique capsule, sérotype 4	Statens Serum Institute (Copenhague) Collection du Dr Austrian,
Pn5M	Isolat clinique capsule, sérotype 5	University of Pennsylvania, PA, USA
R800	Dérivé de la souche R6	(Martin <i>et al.</i> , 1985)
R1501	R800 but <i>comC</i> ₀	(Dagkessamanskaia <i>et al.</i> , 2004)
R1818	R1501 but <i>comC</i> ₀ , <i>hexA::ermAM</i> ; Ery ^R	Cette étude
R2112	<i>comC</i> ₀ , <i>hexA::ermAM</i> , <i>cps::luc</i> (pRJST1), <i>cps</i> ⁺ ; Cm ^R , Ery ^R	Cette étude
R2113	<i>comC</i> ₀ <i>hexA::ermAM</i> , <i>cre</i> _{mut} - <i>cps::luc</i> (pRJST2); Cm ^R , Ery ^R	Cette étude
R2124	<i>comC</i> ₀ <i>hexA::ermAM</i> , <i>cps::luc</i> (pRJST1), <i>ccpA::spc</i> ^A ; Cm ^R , Ery ^R , Spc ^R	Cette étude
R2126	<i>comC</i> ₀ <i>hexA::ermAM</i> , <i>cre</i> _{mut} - <i>cps::luc</i> (pRJST2), <i>ccpA::spc</i> ^A ; Cm ^R , Ery ^R , Spc ^R	Cette étude
R2137	R1501 but <i>licI::luc</i> (pRJST3), <i>licI</i> ⁺ ; Cm ^R	Cette étude
R2145	R1501 but <i>licI::luc</i> (pRJST3), <i>licI</i> ⁺ , <i>ccpA::spc</i> ^A ; Cm ^R , Spc ^R	Cette étude
R2170	R2137 but <i>ciaR</i> mutant	Cette étude
<i>E. coli</i>		
LE392	F ⁻ e14 ⁻ (McrA ⁻) <i>hsdR514</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>glnV44 supF58 lacY1 gal K2 galT22 metB1 trpR55</i>	(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)
Plasmides		
pR424	ColE1 (pEVP3) derivative, Cm ^R ; carries the <i>luc</i> gene	(Chastanet <i>et al.</i> , 2001)
pRJST1	pR424 derivative, Cm ^R ; carries a <i>cre-cps</i> targeting fragment (from the TIGR4 strain); insertion-duplication in <i>S. pneumoniae</i> generates a <i>cre-cps::luc</i> fusion	Cette étude
pRJST2	pRJST1 but $\Delta cre-cps$; insertion-duplication in <i>S. pneumoniae</i> generates a $\Delta cre-cps::luc$ fusion	Cette étude

pRJST3	pR424 derivative, CmR; carries a <i>cre-lic1</i> targeting fragment (from the TIGR4 strain); insertion-duplication in <i>S. pneumoniae</i> generates a <i>lic1::luc</i> fusion	Cette étude
--------	--	-------------

Primers (clonage)	Séquence ^a ; gène; position ^b	
<i>cat</i>	AAGTGGCTCTAACTTATCCCAATAACC; <i>cat</i> ; +231	Cette étude
<i>choF</i>	CGC <u>aagctt</u> GAAGGGCAGTAAGTCAAGTAATCACTTT; <i>spr1149</i> ; -259	Cette étude
<i>choR</i>	CGC <u>ggatcc</u> CGGCAAGAATTCCTGCATAAATC; <i>spr1149</i> ; +3	Cette étude
<i>cpsF</i>	CGC <u>aagctt</u> ACGAAAATCTATTGAATATGCCA; <i>cpsA</i> ; -254	Cette étude
<i>cpsR</i>	CGC <u>ggatcc</u> CGTGATTTTTTTAAAACGTCTACTCAT, <i>cps4A</i> ; +25	Cette étude
<i>cremut1</i>	ATTGTT <u>ACTCGATCGGACACCTGTCCTGAACGATTTGTT</u> C; <i>cpsA</i> ; -144	Cette étude
<i>cremut2</i>	GGACAGGT <u>GTCCGATCGAGTAACAATGTTTTAGAAAGCA</u> G; <i>cpsA</i> ; -158	Cette étude
<i>luc</i>	CTGCCAACCGAACGGACATTTC; <i>luc</i> ; +171	Cette étude
<i>spr1149</i>	GTCAGCACCACCCTTTGTAATGATG; <i>spr1149</i> ; +227	Cette étude
<i>spr1150</i>	AGCAGTGGTCAAAATCGTACAAGC; <i>tacF</i> ; +267	Cette étude
<i>ccpA1</i>	CTCAAACGGAACTATTCGAAACTA; <i>ccpA</i> ; +506	Cette étude
<i>ccpA2</i>	GCTCAAAAATTAGAAAGCCTTCTG; <i>ccpA</i> ; -461	Cette étude

Primers (RT-PCR)	Séquence ^a ; gène; position ^b	
<i>16S rRNA forward</i>	CATGCAAGTAGAACGCTGAAGGAGG; 16S rRNA; + 7	Cette étude
<i>16S rRNA reverse</i>	CCAGGCAGGTTACCTACGCGTACT; 16S rRNA; + 80	Cette étude
<i>bgaA forward</i>	CGCTCAAGGAAGATGCTAAAGCTG; <i>bgaA</i> ; +388	Cette étude
<i>bgaA reverse</i>	CCACGTAGATACGTCTGCATCAGGT; <i>bgaA</i> ; +535	Cette étude
<i>ccpA forward</i>	GGTCATAAAGAGGTTGGGCAATCG; <i>ccpA</i> ; +749	Cette étude
<i>ccpA reverse</i>	TGGCAGCAGGAGTCTTGAACG; <i>ccpA</i> ; +865	Cette étude

<i>codY</i> forward	CTCGCTCTGTGATTGTCAATGCTCT; <i>codY</i> ; +13	Cette étude
<i>codY</i> reverse	GGTTCCTTCATTCCAAGTGAGCG, <i>codY</i> ; +649	Cette étude
<i>cps4A</i> forward	GTTGGTGTTCTCTATCCTTGTCAGC; <i>cps4A</i> ; +233	Cette étude
<i>cps4A</i> reverse	TCGCATTAAACGATTGGTCAGTCC; <i>cps4A</i> ; +291	Cette étude
<i>cps4B</i> forward	CGAACCATTGTTTCTACCTCTCACC; <i>cps4B</i> ; +102	Cette étude
<i>cps4B</i> reverse	AGTCACTCGCCACTTCCTTAGC; <i>cps4B</i> ; +195	Cette étude
<i>cps4C</i> forward	TGAATCGCAATCAAGGAGACAAGC; <i>cps4C</i> ; +169	Cette étude
<i>cps4D</i> forward	ACACCGCCTATTGGAATTGTTATTG; <i>cps4D</i> ; +453	Cette étude
<i>cps4D</i> reverse	GCCTCACCTGTTGCTGTTACC; <i>cps4D</i> ; +518	Cette étude
<i>cps4E</i> forward	ACACCGCCTATTGGAATTGTTATTG <i>cps4E</i> ; +372	Cette étude
<i>cps4E</i> reverse	AGCCATCTAACTCCGTCTTCATCTC <i>cps4E</i> ; +495	Cette étude
<i>cps4F</i> forward	TGATGGCATGGGCTGGTATGG; <i>cps4F</i> ; +352	Cette étude
<i>cps4F</i> reverse	CATCTTGTTTCACTCCACCTACGG <i>cps4F</i> ; +439	Cette étude
<i>cps5A</i> forward	AGCACCGACTGGGACTGATAATG; <i>cps5A</i> ; +365	Cette étude
<i>cps5A</i> reverse	CAAGTAAGACGAACTCTGGTTGACC; <i>cps5A</i> ; +443	Cette étude
<i>cps5B</i> forward	CAAGTCAAGAGAGGAAAGCAAGGC; <i>cps5B</i> ; +47	Cette étude
<i>cps5B</i> reverse	GACGGTGAGAGGTAGAGACAATGG; <i>cps5B</i> ; +105	Cette étude
<i>cps5C</i> forward	ACAACACTGGAGGAGGCAAGAC; <i>cps5C</i> ; +477	Cette étude
<i>cps5C</i> reverse	TCACTCGTGTGTCCAAAAGTTCAAG; <i>cps5C</i> ; +591	Cette étude
<i>cps5E</i> forward	AGACCTGCCCTTTGGAATCAATTTG; <i>cps5E</i> ; +339	Cette étude
<i>cps5E</i> reverse	TGATTTGTGCCCAACCTGTTAAACC; <i>cps5E</i> ; +411	Cette étude
<i>cps5F</i> forward	CGCAAAGGAATTGTAGAGGGAAGTC; <i>cps5F</i> ; +34	Cette étude
<i>cps5F</i> reverse	TGACCTCTCTCAACAAGATCCTCAC; <i>cps5F</i> ; +142	Cette étude

<i>eno forward</i>	TTACTGATGTTTACGCTCGCGAAGT; <i>eno</i> ; +10	Cette étude
<i>eno reverse</i>	CCGAAAGCACCTGATTCAGTGTAAG; <i>eno</i> ; +73	Cette étude
<i>fba forward</i>	GCAGAAAAATTTGTCCAAGCAGCC; <i>fba</i> ; +15	Cette étude
<i>fba reverse</i>	GCGCAAGATAGCTTGAGTCCACTCA; <i>fba</i> ; +107	Cette étude
<i>gyrA forward</i>	GCCAAAGGGCTACCAGTAGTCAATC; <i>gyrA</i> ; +1731	Cette étude
<i>gyrA reverse</i>	AAGCATCATCACTGCGATCAGACTC; <i>gyrA</i> ; +1826	Cette étude
<i>ilvB forward</i>	TTAGAATCTCCTAAGACGGGGTCGG; <i>ilvB</i> ; +15	Cette étude
<i>ilvB reverse</i>	CACCACCAGGATAACCAAAGATGG; <i>ilvB</i> ; +79	Cette étude
<i>licC forward</i>	CAGAAGGATACACCACTAAGGATGC; <i>licC</i> ; +401	Cette étude
<i>licC reverse</i>	TGGAGATGACTACAAGGTTCAAGAC; <i>licC</i> ; +451	Cette étude
<i>licD1 forward</i>	ACCGTTGAAGATGCCAAACAAATTG; <i>licD1</i> ; +12	Cette étude
<i>licD1 reverse</i>	TCGTCGTCCCAAGGGATAAAGC; <i>licD1</i> ; +136	Cette étude
<i>licD2 forward</i>	CATCCGCCACAAAGGTATGATTCC; <i>licD2</i> ; +119	Cette étude
<i>licD2 reverse</i>	TCAGTAAACGCTCATAATCCTCACG; <i>licD2</i> ; +174	Cette étude
<i>livJ forward</i>	GTTTGTGGCGCTTGCAAGTG TAG; <i>livJ</i> ; +23	Cette étude
<i>livJ reverse</i>	TTCCGTATGCAGCTAAAGAACCTGA; <i>livJ</i> ; +147	Cette étude
<i>pck forward</i>	CTGAACCTCCATAAGAAGCCAAACC; <i>pck</i> ; +676	Cette étude
<i>pck reverse</i>	GGACTGTCTATAAGGAAGAGCAAGG; <i>pck</i> ; +750	Cette étude
<i>pfk forward</i>	TTCCTTCACTCAGCTCGTTACCC; <i>pfk</i> ; +198	Cette étude
<i>pfk reverse</i>	TCCGTCACCACCGATAACAACACTAC; <i>pfk</i> ; +288	Cette étude
<i>ldh forward</i>	TTGTCGGTGATGGTGCTGTAGG; <i>ldh</i> ; +34	Cette étude
<i>ldh reverse</i>	AAGGCAAGGGCGTGACTAAGG; <i>ldh</i> ; +158	Cette étude
<i>ptsEII forward</i>	AACCTTGTGTTTTGCTTAGAAGCGG; <i>pts (sp0645)</i> ; +27	Cette étude
<i>ptsEII reverse</i>	TGATCAAGGCTTCACGATAAGTTGG; <i>pts (sp0645)</i> ; +138	Cette étude

<i>pyk forward</i>	TAAAAATCGTTGCAACTTTGGGTCC; <i>pyk</i> ; +13	Cette étude
<i>pyk reverse</i>	GTTTTTCACCCCAGTATCCGTCCT, <i>pyk</i> ; +73	Cette étude
<i>sp1271 forward</i>	AACCGCTTCTACCACTGTGTCC; <i>sp1271</i> ; +289	Cette étude
<i>sp1271 reverse</i>	CTTATCGTCCGCTTACTCCAGAGG; <i>sp1271</i> ; +404	Cette étude
<i>sp1272 forward</i>	TGCCAATGCCAATATGCTCTTCAC; <i>sp1272</i> ; +653	Cette étude
<i>sp1272 reverse</i>	GCTATAACGGTCACAATTCGCTGAG; <i>sp1272</i> ; +742	Cette étude
<i>tpi forward</i>	CAAGTATCTGCTGCATTGGCTGGAT; <i>tpi</i> ; +459	Cette étude
<i>tpi reverse</i>	TACCAGTACCGATAGCCCAGATTGG; <i>tpi</i> ; +548	Cette étude

^C: le mini-transposon inséré est co-transcrit selon la même orientation que le gène cible.

^A: le mini-transposon inséré est co-transcrit selon avec une orientation inverse vis-à-vis du gène cible.

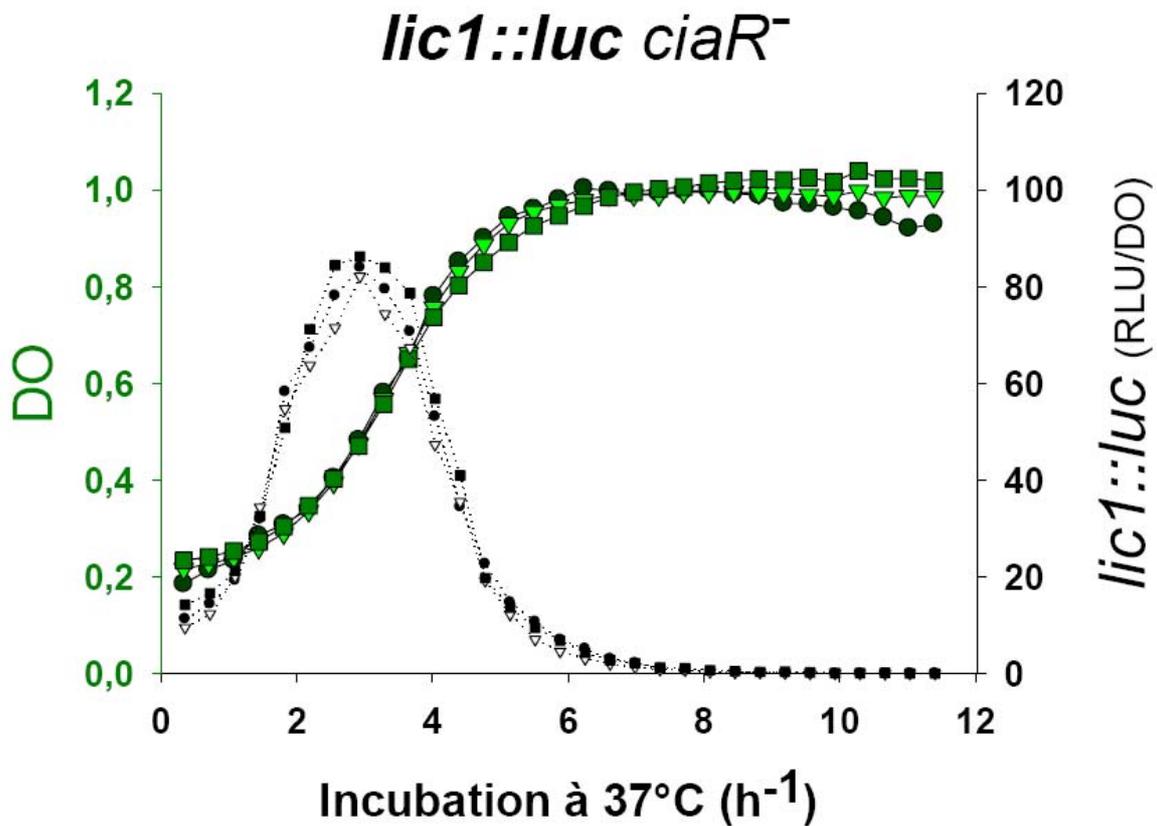
^R: résistant.

^S: sensible.

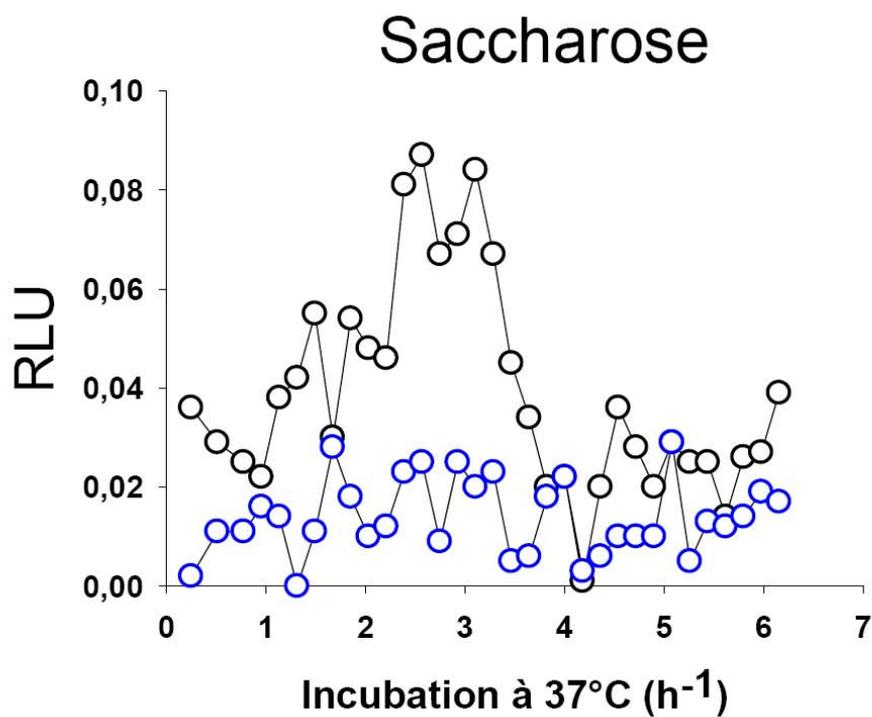
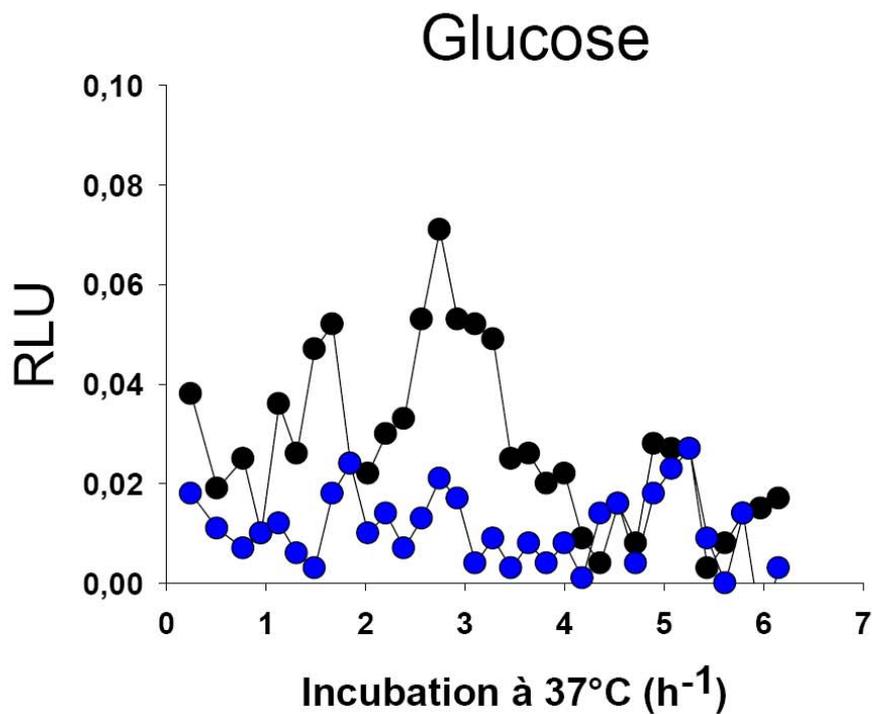
^a: les lettres en minuscule au niveau de la séquence des primers correspondent à l'extension permettant d'introduire un site de restriction. Les codons qui ont été modifiés dans les primers *cremut1* et *cremut2* pour la réalisation du mutant *cremut-cps* sont indiqués en italiques et soulignés.

^b: position relative en paires de bases vis à vis de l'ATG du gène correspondant (ou du premier gène de l'opéron), - en amont, + en aval.

Annexe 7. Evaluation de l'impact de la mutation du gène *ciaR* sur le niveau d'expression de *lic1*, et de l'effet de la concentration en choline sur ce mutant. La croissance (DO_{492nm}) et l'activité luciférase (RLU/DO) ont été suivies durant la culture du mutant *ciaR*⁻ en milieu M17, contenant du saccharose à 12 g/l (symboles vides). Croissance = symboles verts, expression de *lic1* = symboles noirs. Cercles = M17 classique, triangles = M17 + 1,25 g/l de chlorure de choline, et carrés = M17 + 5 g/l de chlorure de choline.



Annexe 8. Comparaison de la luminescence brute obtenue pour la culture de la souche *cps::luc* (*cre* sauvage, R2112, en noir) avec celle obtenue en milieu M17 seul (en bleu) sur glucose ou saccharose à 12 g/l.



Annexe 9. Alignement de séquence entre le gène *ccpA* sauvage, et le gène *ccpA* muté dans la souche R2145 (*lic1::luc, ccpA-*).

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
<i>ccpA</i>	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
<i>ccpA</i> mut	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Consensus	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
<i>ccpA</i>	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
<i>ccpA</i> mut	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Consensus	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
<i>ccpA</i>	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
<i>ccpA</i> mut	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Consensus	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
<i>ccpA</i>	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
<i>ccpA</i> mut	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Consensus	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
<i>ccpA</i>	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
<i>ccpA</i> mut	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Consensus	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
	651	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780
<i>ccpA</i>	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
<i>ccpA</i> mut	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Consensus	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
	781	790	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910
<i>ccpA</i>	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
<i>ccpA</i> mut	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Consensus	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
	911	920	930	940	950	960	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040
<i>ccpA</i>	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
<i>ccpA</i> mut	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Consensus	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													

Annexe 10. Aligement de sites *cre* potentiels positionnés en amont des opérons *cps* de différentes espèces capsulées.

Organisme	Séquence	Distance de l'ATG
Consensus <i>cre</i> (Weickert and Chambliss, 1990)	T G W N A N C G N T N W C A	
<i>Lactococcus lactis</i> SMQ461	T G A A A C C G T <u>A</u> T T <u>G</u> <u>I</u>	- 148 pb <i>epsR</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i> sérotype 3	T G T A A A <u>T</u> <u>A</u> A <u>A</u> T T C A	- 155 pb <i>cpsA</i>
sérotype 4	T G T A A A <u>T</u> <u>A</u> A <u>A</u> T T C A	- 155 pb <i>cpsA</i>
sérotype 5	T G T A A A <u>T</u> <u>A</u> A <u>A</u> T T C A	- 148 pb <i>cpsA</i>
sérotype 6	T G T A A A <u>T</u> <u>A</u> A <u>A</u> T T C A	- 155 pb <i>cpsA</i>
<i>Streptococcus mitis</i> NCTC 12261	T G A A A A C G C <u>C</u> T T <u>A</u> <u>C</u>	-77 pb <i>cpsA</i>
<i>Streptococcus mutans</i> UA159 <i>gtfBC</i> operon	<u>A</u> G A A A G <u>G</u> <u>T</u> G T T A C A	- 45 pb <i>gtfB</i>
<i>ftf</i> gene	T G A A A A <u>T</u> G A G A T G A	- 117 pb <i>ftf</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i> Souche TIGR4	<u>A</u> G A A A T C G A T T T <u>G</u> A	- 163 pb <i>cpsA</i>
Souche D39	<u>A</u> G A A A A C G A T T T <u>G</u> A	- 161 pb <i>cpsA</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i> GAS	T G A A A A <u>G</u> <u>T</u> T T G <u>C</u> <u>T</u> A	- 204 pb <i>hasA</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i> Souche LY03	T G A A A A C G T T T T C <u>T</u>	- 103 pb <i>epsA</i>
Souche MTC330	T G A A A A C G T T T T C <u>T</u>	- 100 pb <i>epsA</i>
Souche MTC360	T G A A A A C G T T T T C <u>T</u>	- 154 pb <i>epsA</i>
Souche MR-2C	T G A A A A C G T T T T C <u>T</u>	- 100 pb <i>epsA</i>
Souche Sfi6	T G A A A A C G T T T T C <u>T</u>	-103 pb <i>epsA</i>

