

## Prise en charge des pneumonies graves à pneumocoque — Pneumonies communautaires aiguës sévères à *Streptococcus pneumoniae* (PAC Sp) : rôle de l'hôte et des facteurs de virulence bactérienne

Management of severe pneumococcal pneumonia — Severe acute community-acquired *Streptococcus pneumoniae* pneumonia (CAP SP): role of the host and bacterial virulence factors

J.-P. Bedos · P. Moine

© SRLF et Springer-Verlag France 2010

### Introduction

Stenberg et Pasteur ont mis en évidence, en 1880, *Streptococcus pneumoniae* (Sp), diplocoque à Gram positif, dans la salive humaine, ainsi que son rôle pathogène après inoculation de lapins avec cette salive humaine [1]. La reconnaissance du pneumocoque comme principale cause de la « pneumonie lobaire humaine » évoquée par Carl Friedlander en 1882 revient à Anton Weichselbaum quelques années plus tard. Le « paradoxe existentiel » de cette bactérie est qu'elle est à la fois commensale du rhinopharynx dès la prime enfance [2] et dans le même temps la principale cause de pneumonies communautaires (PAC) hospitalisées, dont la mortalité est de l'ordre de 30 % en réanimation, pouvant atteindre 40 % en cas de ventilation mécanique invasive et être supérieure à 50 % en cas de choc septique [3,4]. Sp a permis la découverte de nombreux concepts fondamentaux dans les domaines de l'immunologie et de la génétique [5]. En particulier, le phénomène de transformation qui permet des modifications évolutives du « fond génétique » d'une souche par transfert horizontal d'ADN « étranger ». Ce phénomène nécessite un état de « compétence » régulé par un système de *quorum sensing* [6]. Avec l'avènement de la pénicilline en 1940, la mortalité globale des PAC Sp hospitalisées a diminué de façon drastique, mais est restée de l'ordre de 15 % durant les 50 dernières années. En particulier, la mortalité précoce qui reste importante dans les trois à cinq premiers jours est peu influencée malgré une antibiothérapie adéquate [7].

Ainsi, ni les progrès de l'antibiothérapie, ni la qualité de prise en charge en réanimation, ni l'émergence de souches de pneumocoques de « sensibilité diminuée » aux bêta-lactamines n'ont réellement modifié la mortalité des pneumonies des pneumocoques. Cela incite à une meilleure compréhension de la physiopathologie de la pneumonie à pneumocoque, fruit d'une complexe interaction hôte-pathogène en termes de réponses inflammatoires et immunitaires. La connaissance, d'une part de l'hôte en termes de terrain et de comorbidités favorisant, de susceptibilité génétique au pneumocoque et d'autre part de facteurs de virulence de cette bactérie pourra à terme conduire à une prise en charge « personnalisée ».

### Quels facteurs de risque chez l'hôte ?

L'incidence des PAC Sp chez l'adulte augmente dès l'âge de 50 ans pour croître sans cesse et atteindre 90 cas/100 000, chez les personnes de 80 ans et plus avec une mortalité très élevée dans cette tranche d'âge. Si le nombre important de comorbidités est fréquent sur ce terrain, l'âge est un risque indépendant de mortalité en rapport avec une dysfonction immunitaire propre aux personnes âgées [8]. Certaines populations, race noire, personnes natives d'Alaska, population aborigène d'Australie ou Maoris de Nouvelle-Zélande semblent plus à risque que la population caucasienne [9]. Outre la possibilité de réels facteurs génétiques favorisant liés à la race, d'autres facteurs peuvent contribuer à ces disparités : conditions socio-économiques défavorables, comorbidités nombreuses, immunodépression, infection VIH plus fréquente. Plusieurs maladies chroniques semblent favoriser la survenue et parfois la gravité des infections à pneumocoques telles les PAC à Sp : bronchite chronique, bronchopathie chronique obstructive (BPCO), asthme, insuffisance rénale chronique, insuffisance cardiaque, maladie neurologique chronique, alcoolisme aigu, cirrhose,

---

J.-P. Bedos (✉)

Service de réanimation médicochirurgicale,  
centre hospitalier de Versailles, hôpital Mignot,  
177, rue de Versailles, F-78157 cedex Le Chesnay, France  
e-mail : jpbedos@ch-versailles.fr

P. Moine

Department of anesthesiology,  
University of Denver Colorado, USA

syndrome néphrotique [10]. Une infection respiratoire virale préexistante, à virus *Influenzae* en particulier, est un facteur favorisant classique d'une pneumonie à pneumocoque [11]. L'infection virale augmente l'adhérence et l'invasivité de Sp [12]. De nombreuses conditions d'immunodépression, autant celles touchant l'immunité humorale que cellulaire, favorisent les pneumonies à pneumocoques : asplénie fonctionnelle, congénitale, splénectomie chirurgicale, drépanocytose, myélome, lymphomes, transplantations d'organes, greffe de moelle osseuse, leucémies, thérapeutiques immunosuppressives, déficit en immunoglobulines, en fractions du complément et infection VIH [10]. Ces différents terrains immunodéprimés ne sont pas tous associés à une mortalité plus importante. Concernant la neutropénie, la pneumonie à pneumocoque reste rare chez ces patients en dehors d'autres atteintes immunitaires.

Outre le terrain, la présence de défaillances d'organes (pulmonaire, hémodynamique, rénale, neurologique, hématologique) aggrave le pronostic. En revanche, l'impact pronostique d'une bactériémie positive à pneumocoque reste discuté. Dans une étude française que nous avons menée sur 465 pneumonies à pneumocoques hospitalisées, dont 221 étaient bactériémiques, nous avons retrouvé une mortalité au troisième jour significativement supérieure chez les patients ayant des hémocultures positives [13]. En revanche, la mortalité tardive au 30<sup>e</sup> jour n'était pas significativement influencée par la présence ou l'absence d'une bactériémie (18,1 versus 14,8 %) [13]. D'autres études ont retrouvé, dans des populations à prédominance caucasienne, cette différence d'impact dans le temps de la présence d'hémocultures positives : augmentation de la mortalité précoce [14], pas d'incidence sur la mortalité globale [15].

En revanche, ces résultats sont contradictoires avec ceux d'une étude menée dans neuf pays asiatiques sur 233 pneumonies à pneumocoques chez l'adulte, et qui retrouve une mortalité globale beaucoup plus élevée parmi les patients bactériémiques (31,9 %) par rapport aux patients non bactériémiques (5 %) [OR : 8,9 ; IC 95 % : 3,5–23,4 ;  $p < 0,01$ ] [16]. Ces différences de susceptibilité interethniques, mais aussi en termes de pronostic, non expliquées par des facteurs socio-économiques, supportent la possibilité que des différences génétiques de la réponse immunitaire de l'hôte jouent un rôle important.

### Quels facteurs pronostiques génétiques de susceptibilité et de mortalité des pneumonies à Sp chez l'hôte ?

Malgré la fréquence et la gravité des infections invasives à pneumocoques, assez peu d'études d'immunogénétiques se sont intéressées à cette pathologie. L'importance de l'hôte a pourtant été parfaitement démontrée dans des modèles

murins, soit en comparant la réponse immune de souris ayant des profils génétiques différents, soit en utilisant des souris génétiquement modifiées.

La plupart des études sont des études de susceptibilité à une infection pneumococcique invasive et non de pronostic [17]. Elles peuvent s'intéresser à la recherche de « phénotypes extrêmes » : détection par des tests sanguins de l'absence ou du dysfonctionnement de certaines protéines de l'immunité innée et mise en évidence d'un polymorphisme au niveau du gène codant pour cette protéine. Ainsi, sept études de ce type concernant Sp, à l'origine d'infections récurrentes ou familiales ont été publiées [17]. Elles concernent le facteur 2 du complément avec un seul polymorphisme retrouvé [18], l'enzyme IRAK 4 (*interleukine-1 receptor-associated kinase*), à l'origine de la médiation de l'activation des récepteurs Tolls avec huit différents polymorphismes décrits [19–22], l'enzyme Nemo (*nuclear factor  $\kappa$ B essential modulator protein*) qui module l'activation du facteur transcriptionnel NF $\kappa$ B à l'origine de la réponse inflammatoire ; plusieurs polymorphismes existent dans le gène *IKBK* codant pour cette protéine [22,23].

Une autre approche est celle des études cas-témoins où un gène candidat est sélectionné sur la base de résultats de modèles expérimentaux animaux ou d'hypothèses physiopathologiques. L'association entre polymorphismes génétiques (insertion-délétion, changement portant sur une seule base telle qu'une inversion, répétitions de séquences identiques...) au niveau de ce gène et susceptibilité ou sévérité de l'infection pneumococcique est recherchée comparativement entre la population infectée et une population témoin, le plus souvent appariées sur l'ethnie [17]. Malheureusement, de nombreux problèmes méthodologiques entachent la valeur de ces études : effectifs trop petits, population témoin hétérogène et non appariée sur l'âge et le sexe, contrôles de qualité de l'extraction de l'ADN et du génotypage rarement réalisés.

Il existe chez l'homme 15 études cas-témoins publiées concernant la susceptibilité aux infections invasives à pneumocoques [17], dont une seule s'intéresse spécifiquement aux pneumonies à pneumocoques de l'adulte. Ces études s'intéressent aux polymorphismes génétiques au niveau de différents gènes candidats de l'immunité innée : récepteurs TLR2 ou 4 [24], Toll-IL 1 *receptor domain containing adaptor protein* (TIRAP) [25], inhibiteurs du NF $\kappa$ B [26] (NF $\kappa$ BIA ou IB, IE), récepteur CD 14 [27], ainsi que de l'immunité acquise, notamment récepteur au fragment Fc des immunoglobulines G2 (Fc $\gamma$ RIIa) [27–30], molécule de reconnaissance bactérienne activant le complément *mannose-binding lectin* (MBL) [31–33] ; du relargage de cytokines pro (TNF, IL6, LTA) ou anti-inflammatoire (IL10) [34,35] ; de divers facteurs comme la *C reactive protein* (CRP) [36] ; la *protein tyrosine phosphatase* (PTPN22) qui régule la réponse immune lymphocytaire

[37] ; ou la L-ficoline (FCN2), molécule de reconnaissance bactérienne [38].

Des polymorphismes dans les gènes *MBL2*, *PTN22* semblent associés à une plus grande susceptibilité à une infection invasive à *Sp*. Des polymorphismes dans les gènes *NFKB1A*, *NFKBIE* et *TIRAP* semblent associés à un effet protecteur d'une infection invasive à pneumocoque. En revanche, aucune association n'a été retrouvée avec des polymorphismes au niveau des gènes codant pour TLR2 ou 4, récepteur CD14, Fc gammaRIIa, IL6, IL10, LTA, CRP, FCN2.

Malgré tout, aucun de ces résultats ne peut être considéré comme définitif du fait, d'une part des problèmes méthodologiques rencontrés dans toutes ces études, d'autre part de la complexité des interactions hôte–pathogène que toutes ces études n'abordent que d'une manière « simpliste ». Des études d'associations « méthodologiquement correctes » sur de larges effectifs bien sélectionnés, associées à l'étude du génome complet, doivent être conduites avant de conclure à l'absence d'influence de facteurs génétiques.

Pour ne citer qu'un exemple, l'analyse des études s'intéressant aux polymorphismes du récepteur Fc gammaRIIa est assez démonstrative des discordances de résultats obtenus et des difficultés d'interprétation. En effet, la première étude qui s'intéresse spécifiquement aux pneumonies à pneumocoques, avec un petit effectif de patients, montre une association entre le génotype Fc gammaRIIa-R/R131 et la survenue d'une pneumonie bactériémique à pneumocoque [28]. Une étude belge, toujours avec un petit effectif, ne retrouve aucune association entre le génotype Fc gammaRIIa et la survenue d'une infection invasive à pneumocoque [30]. Enfin, une étude française non encore publiée regroupant 243 patients sévères de réanimation ayant soit une pneumonie à pneumocoque (82 %), soit une méningite (22 %) ne retrouve aucune association entre un quelconque génotype du récepteur Fc gammaRIIa et la susceptibilité à ces infections invasives à pneumocoques. En revanche, le génotype Fc gammaRIIa-R/R131 est indépendamment associé à un effet protecteur avec une survie accrue.

Plusieurs études ont montré que des polymorphismes au niveau du TNF, de LTA, d'une protéine du surfactant (SPA), de protéine immunomodulatrice telle HSP70-2+1267, de l'IL6, IL10, ACE (enzyme de conversion de l'angiotensinogène) étaient associés à la gravité des états infectieux et des pneumonies communautaires. Récemment, il a été retrouvé qu'un polymorphisme associé à une expression élevée de *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) était associé à une moindre mortalité [39]. Aucune étude « méthodologiquement adaptée » ne concerne spécifiquement les pneumonies à pneumocoque sévères. Actuellement, une étude multicentrique française « Streptogene », où plus de 350 pneumonies à pneumocoque documentées et sévères hospitalisées en réanimation ont déjà été incluses sur 600 patients attendus, est en cours. L'objectif principal de

cette étude est d'identifier des profils génétiques spécifiques de l'hôte et/ou des souches de *Sp* associés à la morbidité des pneumonies pneumococciques en termes de mortalité en réanimation et au 28<sup>e</sup> jour et en termes de sévérité clinique (choc septique, défaillance multiviscérale, besoin en techniques d'assistance vitale).

## Quels sont les facteurs pronostiques liés à la souche de *Sp* ?

Dans la relation hôte–pathogène, le micro-organisme joue probablement un rôle actif qui est déterminant. Le pneumocoque est d'ailleurs un facteur indépendant de mauvais pronostic des pneumonies communautaires admises en réanimation [3]. Il existe 91 sérotypes définis par des antigènes capsulaires polysaccharidiques différents. Des données expérimentales obtenues dans un modèle murin ont retrouvé une relation entre la mortalité des animaux infectés et certains sérotypes de souches infectantes qui étaient des souches cliniques. Ainsi, chez la souris, la majorité des sérotypes 1, 3, 4, 5 sont virulents et à l'inverse les sérotypes 9, 14, 19, 23 sont avirulents ; la virulence des souches de sérotype 6 étant intermédiaire [40,41]. Ces différences de virulence ne semblent en rapport ni avec des quantités différentes de capsule, ni avec l'origine clinique de la souche, ni avec le niveau de pneumolysine (poumon, LCR, sang) [41].

Chez l'homme également, certains sérotypes (les sérotypes 3, 6B en particulier) semblent conduire à des infections plus sévères avec une mortalité plus élevée [42]. En France, les sérotypes le plus souvent à l'origine d'infections invasives sont actuellement les sérotypes 19A, 7F, 3 et 1 (centre national de référence du pneumocoque, CNRP 2009). Au-delà du sérotype, l'appartenance clonale (MLST) semble beaucoup plus précise, car pour un même sérotype peuvent exister différents clones conduisant à un pronostic différent d'une infection invasive à *Sp* [43]. L'analyse des facteurs de virulence des souches de *Sp* et de leur contrôle génétique est indispensable pour expliquer la capacité de cette bactérie « colonisante » à donner des infections pulmonaires mortelles.

## Quels sont les facteurs de virulence de *Sp* ?

La virulence est liée aux caractéristiques « intrinsèques » de la bactérie et réside dans la capacité d'une souche à échapper aux systèmes de défense, ou à les utiliser et à se multiplier, et d'exprimer une invasivité locale ou systémique chez un hôte propre. En revanche, le pouvoir pathogène s'exprime par la création de lésions tissulaires caractéristiques secondaires à la réaction inflammatoire engendrée, liée à la libération et à l'activation de différents composants bactériens. Cette réaction inflammatoire plus ou moins intense peut être

protectrice ou délétère et variable, selon la souche de pneumocoque et de plus est sous contrôle génétique de l'hôte. Ce double polymorphisme (bactérie et hôte) rend extrêmement complexe l'étude des mécanismes physiopathologiques survenant au cours d'une pneumonie sévère à pneumocoque.

Les facteurs de virulence et de pathogénicité du pneumocoque sont nombreux (Tableaux 1 et 2). On peut schématiquement répartir ces facteurs de virulence en deux groupes : les éléments de surface du pneumocoque intact (capsule polysaccharidique, paroi cellulaire, protéines de surface) et

d'autres facteurs qui s'expriment lors de la lyse du pneumocoque concourant aux réponses inflammatoires et immunes de l'hôte (pneumolysine, pneumocines...). Par ailleurs, il faut considérer les structures antigéniques de la capsule qui ont permis d'identifier 91 sérotypes de pneumocoques à l'origine des vaccins antipneumococciques, mais conférant une protection purement « sérotype-spécifique ». En revanche, les multiples protéines de virulence de surface ou extracellulaires pourraient conduire à la réalisation de vaccins dont l'efficacité ne serait pas spécifique de quelques

**Tableau 1** Facteurs de virulence du pneumocoque et toxicité pulmonaire

Capsule polysaccharidique	Empêche la clairance mucociliaire, antiphagocytaire, interfère avec les mécanismes d'opsonisation complément (CR3, C3b, iC3b) ou anticorps (fragment Fc des IgG) dépendants, diminue l'autolyse spontanée ou dépendante des antibiotiques, contribue au phénomène de tolérance aux antibiotiques
Paroi cellulaire	
PCho	Ancrage des protéines de surfaces CBPs, adhésine reconnaissant le PAF récepteur (PAFr) des cellules épithéliales de l'hôte contribuant à la transcytose et la dissémination tissulaire bactérienne
LTA	Reconnaît le PAFr, TLR2 ligand, pro-inflammatoire, inhibition des peptides antimicrobiens par D-alanylation
Ply	Toxine cytoplasmique libérée lors de l'autolyse ou exprimée indépendamment de toute autolyse, cytotoxique sur les cellules endothéliales et épithéliales pulmonaires, les neutrophiles et les plaquettes. À concentrations sub-lytiques inhibe l'activité ciliaire de l'épithélium respiratoire, inhibe le « burst oxydatif » des phagocytes, pro-inflammatoire TLR4-dépendante, active la voie classique du complément, stimule l'activation des lymphocytes CD4
Protéines de surface	
PsaA	Lipoprotéine composant d'un système de transport ATP-binding cassette ABC, adhère aux pneumocytes de type II, résistance au stress oxydatif, régulée par le TCSTS04
PspA	Inhibe, inactive, et dégrade C3b inhibant l'opsonisation et la phagocytose, protège de l'effet bactéricide des apolactoferrines humaines, régulée par les TCSTS06 et TCSTS02
PspC (CbpA)	Recrute le facteur H et bloque l'activation et l'adhésion de C3, fixe le composant sécrétoire (pièce S des IgA sécrétoires ou récepteurs des immunoglobulines pIgR), facilitant ainsi l'évasion immune, l'inhibition de l'activité lytique du complément, la transcytose et la dissémination tissulaire, régulée par les TCSTS06
HtrA	Sérine protéase, <i>heat-shock</i> protéine participant à la résistance aux températures élevées et au stress oxydatif, médiateur de l'inhibition par TCSTS05 CiaR/H du phénomène de compétence bactérienne
PavA	Module l'adhérence aux cellules épithéliales et endothéliales, interfère avec l'activité des cellules dendritiques, pro-inflammatoire, stimule la prolifération des cellules lymphocytaires T, adhère à la fibronectine
IgA1 protéases	Dégrade les IgA1 humaines
PiuA, PiaA	Lipoprotéines composant de système de transport ABC
Eno	Adhère aux plasminogène et à la fibronectine
Lyt A	Dégradation de la paroi cellulaire, permettant la libération extracellulaire de la pneumolysine et autres composants cellulaires aux propriétés pro-inflammatoires

PCho : phosphorylcholine ; CBP : *choline-binding protein* ; LTA : acide lipotéichoïque ; Ply : pneumolysine ; PsaA : *pneumococcal surface adhesin A* ; PspA : *pneumococcal surface protein A* ; PspC : *pneumococcal surface protein C* ; HtrA : *high-temperature requirement A* ; PavA : *pneumococcal adherence and virulence factor A* ; PiuA : *pneumococcal iron uptake* ; PiaA : *pneumococcal iron acquisition* ; Eno : Enolase ; LytA : autolysine A ; TCSTS : *two-component signal transduction system*.

<b>Tableau 2</b> Facteurs de virulence du pneumocoque et toxicité pulmonaire	
<b>Métabolisme des carbohydrates et protéines de surface</b>	
Exoglycosidase NanA, StrH, et BgaA	Dégradation enzymatique des glycoprotéines de l'hôte, déglycosylation de protéines innées de l'immunité pulmonaire (lactoferrines, immunoglobulines A, composants sécrétoires [pièce S des IgA sécrétoires]), adhérence aux cellules eukaryotes. Ces 3 exoglycosidases agissent en synergie et consécutivement en exposant les mannoses des cellules hôtes contribuant à l'adhérence aux cellules épithéliales humaines et à la diminution de la clairance bactérienne. Par ce processus de déglycosylation, des glycoconjugués membranaires humains contribuent aussi à la croissance bactérienne
NanA	Aide à la formation du biofilm, clivage des résidus terminaux d'acide sialique des glycoprotéines, glycolipides et oligosaccharides facilitant l'adhérence bactérienne en révélant les récepteurs, déglycosylation des glycoconjugués membranaires, promotion de la résistance à l'opsonisation et à la phagocytose
NanB	Déglycosylation des glycoconjugués membranaires humains contribuant aussi à la croissance bactérienne
SpuA	Adhérence aux pneumocytes de type II par reconnaissance spécifique des glycans extracellulaires et autres ligands non carbohydrates. Dégradation des polysaccharides $\alpha$ -glucans tels que le glycogène et starch (amylose et amylopectine) et utilisation des produits de dégradation comme source exogène d'énergie permettant la croissance bactérienne et facilitant l'invasion pulmonaire ; dans les pneumocytes de type II, le glycogène est un précurseur du surfactant pulmonaire élément clef de l'immunité innée de la muqueuse pulmonaire et sa dégradation facilite l'invasion pulmonaire par diminution des défenses immunitaires pulmonaires
Systèmes protéiques à deux composantes TCSTS	Treize différents systèmes de régulation d'expression et d'activité des protéines de virulence jusqu'ici mis en évidence, ainsi qu'une protéine régulatrice RR489/RitR « orpheline » de son HK. Neuf de ces 13 TCSTS (TCSTS01, TCSTS04, TCSTS05, TCSTS06, TCSTS07, TCSTS08, TCSTS09, TCSTS10, TCSTS13) systèmes et la protéine régulatrice RR489/RitR ont été montrés impliqués dans la virulence du pneumocoque dans un modèle murin de pneumonie. La régulation des gènes de virulence par ces systèmes TCSTS est probablement cruciale dans les capacités de <i>Streptococcus pneumoniae</i> à coloniser l'hôte mais aussi à l'infecter
NanA : neuraminidase A ; StrH : $\beta$ -N-acetylglucosaminidase ; BgaA : $\beta$ -galactosidase ; NanB : neuraminidase B ; SpuA : pullanase ; TCSTS : <i>two-component signal transduction system</i> .	

sérotypes vaccinaux, mais dirigée contre tous les sérotypes [44]. Une simple sélection de ces protéines de virulence sera évoquée ici.

### **Capsule**

La capsule polysaccharidique est l'élément « *sine qua non* » de la virulence du pneumocoque [45–47]. Elle recouvre la paroi cellulaire et est composée de grands polymères polysaccharidiques spécifiques et formant un gel hydrophile à la surface bactérienne [46]. Si des souches non capsulées peuvent être plus adhérentes à l'épithélium respiratoire et à l'origine d'infections superficielles, les souches à l'origine d'infections invasives sont toujours capsulées. Un point très important pour la survie des pneumocoques est la capacité de réguler leur production de capsule pour s'adapter à différents environnements. Ainsi, une expression maximale est essentielle pour la virulence systémique. La capsule

empêche la clairance mucociliaire, mais permet surtout au pneumocoque d'échapper à la phagocytose par les polynucléaires neutrophiles [48]. Ce véritable bouclier inerte s'oppose à l'adhésion aux récepteurs membranaires des cellules phagocytaires et interfère avec les mécanismes d'opsonisation complément ou anticorps dépendants : moindre déposition de complément, inhibition de l'interaction entre le récepteur CR3 des phagocytes et les fragments de dégradation de C3b, iC3b en particulier, et par ailleurs inhibition de l'interaction avec les récepteurs Fc gamma des IgG fixés aux pneumocoques [49–51]. Il existe une grande variabilité entre les sérotypes capsulaires, quant à leur résistance à la phagocytose dans des conditions requérant l'opsonisation, la stimulation de la réponse anticorps, l'activation des différentes voies du complément, leur pénétration dans les tissus et donc leur pathogénicité [52–54]. Il est intéressant de rappeler que l'instillation directe intrapulmonaire de la capsule ne déclenche aucune réaction inflammatoire, alors que

des pneumocoques non capsulés ont de puissantes propriétés inflammatoires. Enfin, la capsule diminue l'autolyse spontanée ou dépendante des antibiotiques des pneumocoques, cela pouvant contribuer au phénomène de tolérance aux antibiotiques de certaines souches [55].

### Paroi cellulaire

Elle est essentiellement constituée de peptidoglycane, acides téichoïques et lipotéichoïques (LTA), et de phosphorylcholine (PCho). PCho permet l'ancrage à la surface cellulaire pneumococcique des protéines de surface du groupe des *choline-binding proteins* (CBPs) [47]. PCho fonctionne aussi comme une adhésine reconnaissant les PAF récepteurs (PAFr) des cellules hôtes activées permettant l'adhérence cellulaire bactérienne et la transcytose ou dissémination tissulaire bactérienne [56,57]. Les quantités de PCho dans la paroi cellulaire sont modulées par une phosphorylcholine estérase (Pce ou CbpE pour *Choline-binding* protéine E), protéine de surface du groupe des *choline-binding proteins* (CBPs) [58–60]. Cette protéine Pce diminue les quantités de PCho à la surface cellulaire modifiant ainsi le phénotype cellulaire bactérien [58,59]. Cette Pce contribue elle-même par sa capacité de liaison au plasminogène humain, précurseur de la plasmine, à l'adhérence cellulaire et à la dissémination tissulaire bactérienne. Par ailleurs, la D-alanylation des LTA participe activement à la protection de Sp face aux polynucléaires neutrophiles et aux peptides antimicrobiens qu'ils sécrètent [60,61]. L'incorporation de charges positives cationiques par la D-alanylation des LTA médiée par l'opéron *dlt* à la surface cellulaire essentiellement chargée négativement va repousser de façon électrostatique les peptides antimicrobiens de nature cationique [60,61].

### Protéines de surface

Les protéines de surface ont un potentiel d'antigènes vaccinaux pouvant stimuler la production d'anticorps opsonisants. Elles jouent un rôle pivot dans la virulence pneumococcique par leurs interactions avec les protéines de la matrice extracellulaire et les récepteurs cellulaires de l'hôte, aboutissant à l'adhérence bactérienne et à son internalisation dans les cellules hôtes [62]. Sp a développé différentes stratégies permettant son adhérence aux cellules de l'hôte, ainsi que son évasion des attaques du système immunitaire et du complément, deux prérequis nécessaires à sa dissémination et à sa survie dans les poumons. Les facteurs de virulence essentiellement requis, à l'exception de la pneumolysine, sont des protéines de surfaces [47,62–64]. Elles se divisent en quatre groupes :

- groupe des choline-binding proteins (CBPs) : essentiellement PspA, PspC (CbpA-SpsA), et les hydrolases, auto-

lysines LytA, LytB, et LytC, et Pce (phosphorylcholine estérase ; CbpE) ;

- groupe des lipoprotéines transporteuses de métaux utiles à la croissance bactérienne : PpmA, SlrA, PsaA, PiaA, et PiuA ;
- groupe de protéines ancrées au peptidoglycane par une sortase (motif LPXTG) telles les neuraminidases (NanA, B et C), IgA1 protéases, Zmp, PrtA, HtrA ;
- les protéines de surface « non-classiques » telles PavA, Eno, et GADPH [47,62].

Les propriétés d'adhésion (classes majeures d'adhésines) sont particulièrement retrouvées pour les CBPs et les protéines de surface « non classiques » [37]. Des mutants de Sp délétés des gènes codant pour ces différentes protéines objectivent une diminution de virulence dans des modèles murins de pneumonies ou de bactériémies [47,62].

### Pneumolysine

La pneumolysine est une toxine cytoplasmique libérée virtuellement par toutes les souches de pneumocoques lors de l'autolyse [63–67]. Elle peut cependant être exprimée indépendamment de toute autolyse [64]. Sa principale action est d'être cytotoxique/cytolytique sur les cellules endothéliales, les cellules épithéliales pulmonaires, les neutrophiles et les plaquettes [68–70]. À des concentrations « sublytiques », elle inhibe l'activité ciliaire de l'épithélium respiratoire, inhibe le « burst oxydatif » des phagocytes, stimule la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF, IL-8), NO, chémokines, et prostaglandines, active la voie classique du complément, stimule l'activation des lymphocytes CD4 [68–70]. Ces activités de modulation cellulaire et d'activation du complément contribuent pleinement à la virulence du pneumocoque dans des modèles murins de pneumonie [71–73]. Néanmoins, un clone de souches de sérotype 1 produisant une pneumolysine dénuée de toute activité cytolitique-hémolytique a été isolé dans le cadre de pathologies pneumococciques invasives [66]. De plus, des souches mutantes exprimant une pneumolysine dénuée d'activité cytolitique-hémolytique et d'activation du complément sont plus virulentes que des souches, dont le gène de la pneumolysine a été délété et qui ne produisent plus d'infection pulmonaire léthale [72]. Cela démontre que la pneumolysine présente d'autres activités de virulence jusqu'ici non encore identifiées. Ces activités seraient TLR4-dépendantes, ces souches mutantes exprimant une pneumolysine, dénuée d'activité cytolitique-hémolytique et d'activation du complément, activent des réponses TLR4-dépendantes via son interaction avec le récepteur TLR4 [74] ; de même, elles stimulent l'expression d'interféron gamma [75].

La pneumolysine joue un rôle majeur dans la virulence pneumococcique dans les pneumonies [71–73,75–77].

Cependant, son importance est toute relative variant d'une souche à une autre [78]. La pneumolysine est nécessaire à la survie du pneumocoque, tant dans les voies respiratoires hautes que basses [79,80], mais aussi pour la diffusion bactérienne du poumon vers la circulation sanguine [79–82]. Dans les pneumonies bactériémiques, si la pneumolysine est exprimée, l'inoculum de pneumocoques systémiques est majeur et l'hôte succombe à l'infection [80–82]. En revanche, en l'absence de pneumolysine, l'inoculum pneumococcique circulant reste élevé, mais est « toléré » sans signes de gravité pouvant aboutir à une bactériémie « chronique » [83,84].

### **Métabolisme des carbohydrates**

Différentes protéines pneumococciques impliquées dans des processus métaboliques basiques, notamment le métabolisme des carbohydrates, sont d'importants facteurs de virulence pneumococcique [85–89]. Les sucres ont une place privilégiée dans le mode de vie, ou de survie, de *Sp* comme le montre l'analyse de son génome : 30 % de tous les systèmes de transport retrouvés sont des systèmes transports des sucres, une proportion beaucoup plus importante que celles retrouvées dans tous les génomes séquencés des bactéries occupant les mêmes sites ou niches écologiques [40]. Trois différents mécanismes sont impliqués dans cette interaction hôte–pathogène et l'infectivité du pneumocoque : l'acquisition cruciale de nutriments par dégradation enzymatique des glycoprotéines de l'hôte (exoglycosidases NanA [neuraminidase A], StrH [ $\beta$ -N-actylglucosaminidase]), dégradation des polysaccharides ( $\alpha$ -glucans tels que glycogène et starch [amylose et amylopectin]) [SpuA pullanase et MalX système ATP-binding-cassette ABC de transport], métabolisme des sucroses (système ATP-binding-cassette ABC de transport SusX), l'adhérence aux cellules eukaryotes (pullanase SpuA, NanA, StrH, BgaA) et l'interférence avec les fonctions immunitaires de l'hôte (exoglycosidases NanA, StrH, et BgaA) [85,87–92].

### **Les systèmes protéiques à deux composantes (two-component signal transduction system [TCSTS]) de régulation des facteurs de virulence**

Les systèmes à deux composants sont constitués d'une protéine senseur de type histidine kinase (HK) localisée dans la membrane cytoplasmique et d'une protéine régulatrice (RR) localisée dans le cytoplasme, généralement un facteur de transcription [93]. La protéine senseur HK reconnaît certains signaux du monde extérieur, telles les conditions environnementales (densité bactérienne, conditions métaboliques, compétition bactérienne...), transmet l'information à l'intérieur de la cellule et active les propriétés de transcription de la protéine régulatrice. Il existe chez *Sp*, 13 différents systèmes de

régulation d'expression et d'activité des protéines de virulence jusqu'ici mis en évidence, ainsi qu'une protéine régulatrice RR489/RitR « orpheline » de son HK [94]. Neuf de ces 13 TCSTS systèmes et la protéine régulatrice RR489/RitR ont été montrés impliqués dans la virulence pneumococcique dans un modèle murin de pneumonie [94]. La régulation des gènes de virulence par ces systèmes TCSTS est probablement cruciale dans les capacités de *Sp* à coloniser l'hôte, mais aussi à l'infecter, et fait l'objet d'intenses recherches d'interprétation souvent délicates : elle reste encore mal connue.

Une méthode d'identification des gènes régulés par ces différents TCSTS est de surexprimer dans une souche de *Sp* les RR/HK. Cependant, des différences majeures d'expression génique sont observées d'une souche à une autre [95,96]. La surexpression de RR/HK06 a ainsi permis d'identifier 53 gènes différemment exprimés dans la souche D39, alors que seulement cinq gènes étaient différemment exprimés dans la souche TIGR4 [35]. Seuls deux gènes, CbpA et un autre gène de fonction hypothétique étaient régulés communément dans les deux souches. Des différences majeures d'expression génique ont aussi été rapportées entre ces deux souches D39 et TIGR4 présentant chacune des délétions en RR/HK04 [96]. De la même façon, D39 (sérotype 2), 0100993 (sérotype 3) et TIGR4 (sérotype 4), toutes délétées en RR/HK04, dans un modèle murin (souris MF1) de pneumonie par instillation nasale, présentent des virulences différentes [96]. Seul le mutant TIGR4 délété en RR/HK04 est significativement moins virulent que sa souche TIGR4 mère ; les souches D39 et 0100993 mutantes ne sont pas significativement moins virulentes que leurs souches mères respectives [96]. Les raisons de ces différences d'expression génique et de virulence restent peu claires.

### **Génétique et facteurs de virulence de *Sp***

Le génome du pneumocoque possède entre 2 millions et 2,2 millions de paires de bases, selon la virulence de la souche, correspondant à plus de 2 000 gènes, dont deux tiers conduisent à des protéines dont les fonctions sont connues [97]. Un panel de plus de 1 500 gènes est nécessaire à la viabilité du pneumocoque [97]. L'identification des gènes requis pour la colonisation ou l'infection et sa dissémination est essentielle. Le nombre de gènes jouant un rôle dans la virulence retrouvés dans les différentes études avec différentes technologies est de l'ordre de plus de 300 gènes, d'ailleurs pas toujours communs entre les études [97–103]. Cela suggère que différents gènes de virulence (hétérogénéité génomique) peuvent être impliqués selon la souche de pneumocoque, tout en confirmant le caractère multifactoriel du processus de virulence. La plupart de ces gènes ont un rôle inconnu. Les effets de ces différents facteurs de virulence sont additifs ou synergiques. Plusieurs polymorphismes ont été décrits concernant la pneumolysine ou Psp

et PsaA. Il existe, à côté de ces polymorphismes « simples » (SNP), des zones de regroupement de gènes ou îlots de pathogénicité codant pour des facteurs de virulence. Le pneumocoque peut réguler l'importance du volume de sa capsule produite en état de colonisation ou en état d'invasion : phénotype transparent (capsule fine) en phase de colonisation précoce et phénotype opaque (capsule épaisse) en phase invasive [104]. Le « déclencheur » de cette variation phénotypique reste à déterminer. Il existe donc à l'évidence une spécificité de site dans l'expression des facteurs de virulence, des transporteurs, des facteurs de transcription, des protéines ribosomiales, des voies métaboliques/énergétiques et des gènes aux fonctions inconnues [105]. Cette modulation différente des gènes de virulence permet à *Sp* une adaptation aux différents environnements de l'hôte [80]. Une étude récente a bien montré *in vivo*, deux profils différents d'expression génétique [105] : un profil caractéristique de pneumocoques retrouvés dans le sang et un profil caractéristique de pneumocoques retrouvés dans les tissus pulmonaires ou cérébraux. Ainsi, dans le sang, sont exprimés les gènes de la pneumolysine et de Psp ; dans le poumon ou le cerveau, les gènes des neuraminidases nanA et B, des gènes du stress oxydatif, ainsi que des gènes de compétence. L'induction de la compétence par un peptide spécifique, le *competence stimulating peptide* (CSP) qui dépend d'un système de *quorum sensing*, non seulement induit la formation d'un biofilm *in vitro*, mais aussi augmente la virulence dans un modèle murin de pneumonie *in vivo*. À l'inverse, une souche mutante délétée en récepteur du CSP ne produit pas de biofilm et montre une moindre virulence dans le modèle animal de pneumonie.

À travers l'ensemble de ces données, on comprend l'unique pouvoir d'adaptabilité du pneumocoque, du fait de sa variabilité sérotypique et de sa plasticité génomique permettant une hétérogénéité de son génome amenant à une grande variabilité possible de chaque souche.

### Quelles interactions entre le pneumocoque et les réponses immunitaires et inflammatoires de l'hôte ?

Outre l'action propre des différents facteurs de virulence du pneumocoque, la sévérité des pneumonies à pneumocoques est aussi la conséquence de différents types de réponses inflammatoires et immunitaires déclenchés par certains composants bactériens. Les composants de la paroi bactérienne, acide lipoteichoïque, peptidoglycane et phosphorylcholine, jouent un rôle majeur dans l'induction de la réponse inflammatoire par leur fixation sur les cellules monocytaires amenant à l'induction de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires. Cette réaction pro-inflammatoire est plutôt à considérer comme une réaction adaptative et protectrice

pour l'hôte vis-à-vis du pneumocoque. Mais on imagine facilement qu'une réponse pro-inflammatoire excessive de l'hôte, pour des raisons de susceptibilité génétique par exemple, puisse conduire au décès.

Ces composants microbiens (*pathogen-associated molecular patterns* ou PAMPs) sont reconnus par des récepteurs spécifiques à la surface des cellules du système immunitaire inné (PRRs) [106].

Plusieurs types cellulaires interviennent de façon coordonnée et séquentielle dans la défense antipneumococcique au niveau pulmonaire. Les macrophages alvéolaires sont la première ligne de défense [107]. Leur apoptose durant l'infection pneumococcique pulmonaire permet de limiter l'invasion sanguine [108]. Secondairement vont être recrutés des polynucléaires neutrophiles grâce à différents médiateurs (facteurs du complément, galectine-3, pneumolysine, alpha chemokines, formyl-méthionine-leucine-phenylalanine ou fMLP). La fréquence très élevée de pneumonies à pneumocoque chez les patients VIH souligne le rôle protecteur majeur et précoce des lymphocytes CD4+ recrutés sous l'influence de la pneumolysine [109]. Ainsi, des souris déficientes en MHC de classe 2, ayant donc un profond déficit en lymphocytes CD4+, sont très susceptibles à la pneumonie à pneumocoque.

Les cellules T *natural killer* ont aussi un rôle protecteur au cours de la pneumonie à pneumocoque [110]. Enfin, les cellules épithéliales alvéolaires en dehors de leur rôle « d'escalator muco-cilié » contribuent à l'immunité innée, à la sécrétion de surfactant (*surfactant protein-D* ou SP-D) et ont des rôles multiples : agrégation des pneumocoques facilitant leur phagocytose et limitant le passage systémique, action anti-inflammatoire [111].

Les *Toll-like* récepteurs (TLRs) jouent un rôle central dans cette reconnaissance. Ils sont exprimés à la surface des cellules « sentinelles » de l'immunité : macrophages, polynucléaires, cellules épithéliales pulmonaires, cellules endothéliales, lymphocytes B et T. Actuellement, dix récepteurs Toll ont été décrits (TLR1–TLR10). Le récepteur TLR2 reconnaît le peptidoglycane et l'acide lipoteichoïque [112]. Le récepteur TLR4, récepteur « clé » du lipopolysaccharide (LPS) reconnaît la pneumolysine [113]. De façon inattendue, quand différentes souris déficientes en récepteurs Toll sont étudiées pour connaître le rôle respectif de ces récepteurs dans la défense antipneumococcique, seules les souris TLR9<sup>-/-</sup> sont très sensibles à l'infection pneumococcique [114]. TLR9, majoritairement localisé dans le cytoplasme des cellules reconnaît l'ADN bactérien après endocytose et semble donc essentiel pour tuer des pneumocoques dans les vacuoles endosomiales [114].

Une étude récente, utilisant un modèle de tissu pulmonaire prélevé chez des patients opérés pour tumeur, puis infectés *ex vivo* par une souche de pneumocoque de sérotype 3,



a permis de mieux comprendre la réponse immune innée précoce [115]. Ainsi, les résultats ont montré :

- que les macrophages alvéolaires et non les cellules épithéliales pulmonaires ont un rôle central initial à l'origine de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ;
- que l'expression des récepteurs TLR2 et 4 est augmentée et que la phosphorylation de la kinase p38 MAPK est accrue ;
- que l'inhibition de TLR2 et 4 n'a qu'un effet inhibiteur faible sur la synthèse des cytokines pro-inflammatoires (IL6, 8, TNF) ;
- qu'en revanche, l'inhibition de p38 MAPK réduit fortement la synthèse par les macrophages alvéolaires de ces cytokines.

Cela souligne qu'au-delà des récepteurs TLRs, les voies de signalisation intracellulaire ont un rôle clé dans l'activation de NF $\kappa$ B, et sont des cibles potentielles au plan thérapeutique pour moduler la réaction inflammatoire due à Sp.

Ainsi, des souris déficientes en protéines de signalisation cellulaire résultant de la stimulation des récepteurs Toll (MyD88, kinase IRAK4 et p38 MAPK), empêchant l'activation de NF- $\kappa$ B et donc la synthèse des médiateurs de l'inflammation, se révèlent très susceptibles aux pneumonies à pneumocoques [116,117].

De façon originale, le récepteur CD14 a un rôle protecteur, en effet, les souris déficientes en récepteur CD14 sont protégées de la dissémination du pneumocoque des alvéoles pulmonaires vers le compartiment sanguin [118].

Les autres récepteurs intervenant dans la reconnaissance du pneumocoque sont : la CRP qui se lie à la phosphorylcholine et active le complément ; la *platelet-activating factor receptor* (PAFr) qui se lie aussi à la phosphorylcholine ; le récepteur *macrophage receptor with collagenous structure* (Marco), exprimé sur les macrophages alvéolaires, permet l'internalisation in vitro du pneumocoque. Une C-lectine nommée SIGNR1, retrouvée au niveau des macrophages de la zone marginale de la rate et non au niveau des macrophages alvéolaires, est impliquée dans la reconnaissance capsulaire [119]. Des souris SIGNR1 $^{-/-}$  sont très sensibles à l'infection pneumococcique et n'éliminent pas Sp des poumons ou du sang [119]. D'autres protéines de reconnaissance intracytoplasmiques (NOD1 et 2, caspase-1) ont une implication clinique encore peu claire. Des souris délétées en ces différentes protéines de reconnaissance deviennent beaucoup plus sensibles à une infection invasive à Sp, en dehors d'une délétion du PAFr et de la caspase-1 qui rendent les souris plus résistantes à l'infection pneumococcique.

En termes de réponse cytokinique, les cytokines ayant un rôle majeur au cours des pneumonies à Sp sont : le TNF alpha, l'IL6, 8, 10 et l'interféron gamma [120]. TNF et IL6 ont un rôle protecteur au cours de l'infection pulmonaire à pneumocoque [121,122]. Ainsi, l'administration d'anticorps

anti-TNF aggrave l'infection pneumococcique : la bactériémie et le taux de mortalité sont augmentés, le nombre de neutrophiles circulants diminué [121]. De même, des souris délétées en IL6 et infectées par voie nasale ont des comptes bactériens pulmonaires six fois plus élevés que des souris normales et meurent plus rapidement [122]. En revanche, l'IL10, cytokine anti-inflammatoire, qui a des effets protecteurs dans de nombreux modèles expérimentaux d'inflammation (endotoxémie, péritonite, pancréatite), a un effet délétère au cours des pneumonies à pneumocoques [123]. Ainsi, dans un modèle murin de pneumonie pneumococcique de sérotype 3, l'administration intranasale d'IL10 recombinant concomitamment de l'infection diminue, l'expression locale pulmonaire des cytokines pro-inflammatoires, la clairance bactérienne pulmonaire et systémique, et le taux de survie du modèle. Le rôle de l'interféron gamma est protecteur ou délétère selon les modèles [124].

Dans un modèle de pneumonie pneumococcique bactériémique léthale, nous avons montré que l'expression pulmonaire locale de différentes cytokines pro-inflammatoires (TNF, IL1 et 6) et anti-inflammatoires (IL10) était très différente, selon la souche inoculée (deux souches de sérotype 3, une souche de sérotype 6 et une de sérotype 19) [125]. Les résultats montrent qu'avec le même inoculum, la cinétique et l'amplitude de l'expression pulmonaire des cytokines pro-inflammatoires sont très différentes selon les souches et ne sont pas dépendantes du sérotype. En revanche, pour l'IL10, si le moment d'expression maximale varie selon les souches, l'amplitude reste identique.

## Conclusion

Au terme de cette revue : des facteurs de susceptibilité/sévérité et de défense propres à l'hôte ; des facteurs de virulence/pathogénicité propres à Sp, à l'origine d'une pneumonie, plusieurs points semblent acquis, mais beaucoup de domaines d'incertitudes demeurent.

**Conflit d'intérêt :** les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêt.

## Références

1. Pasteur (1881) Note sur la maladie nouvelle provoquée par la salive d'un enfant mort de la rage. Bull Acad Med (Paris) 10:94–104
2. Gray BM, Converse GM, Dilton HC (1980) Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage and infection during the first 24th month of life. J Infect Dis 142:923–33
3. Moine P, Vercken JB, Chevret S, et al (1995) Severe community-acquired pneumococcal pneumonia. Scand J Infect Dis 27:201–6

4. Hook EW III, Horton CA, Schaberg DR (1983) Failure of intensive care unit support to influence mortality from pneumococcal bacteriemia. *JAMA* 249:1055–7
5. Watson DA, Musher DM, Jacobson JW, et al (1993) A brief history of the pneumococcus in biomedical research: a panoply of scientific discovery. *Clin Infect Dis* 17:913–24
6. Campbell EA, Choi SY, Masure HR (1998) A competence regulon in *Streptococcus pneumoniae* revealed by genomic analysis. *Mol Microbiol* 27:929–39
7. Austrian R, Gold J (1964) Pneumococcal bacteremia with especial reference to bacteremic pneumococcal pneumonia. *Ann Intern Med* 60:759–76
8. Castle SC (2000) Clinical relevance of age-related immune dysfunction. *Clin Infect Dis* 31:578–85
9. Bruce MG, Deeks SL, Zulz T, et al (2008) International circumpolar surveillance system for invasive pneumococcal disease, 1999–2005. *Emerg Infect Dis* 14:25–33
10. Vander BPC T, Opal SM (2009) Pathogenesis treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet* 374:1543–56
11. Kim PE, Musher DM, Glezen WP, et al (1996) Association of invasive pneumococcal disease with season, atmospheric conditions, air pollution, and the isolation of respiratory viruses. *Clin Infect Dis* 22:100–6
12. Bogaert D, de Groot R, Hermans R (2004) *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis* 4:144–54
13. Jehl F, Bédos JP, Poirier R, et al (2002) Enquête nationale sur les pneumonies communautaires à pneumocoques chez des malades adultes hospitalisés. *Med Mal Infect* 32:267–83
14. Garcia-Vidal C, Fernandez-Sabé N, Carratalà J, et al (2008) Early mortality in patients with community-acquired pneumonia: causes and risk factors. *Eur Respir J* 32:733–9
15. Bordon J, Peyrani P, Brock G, et al (2008) The presence of pneumococcal bacteremia does not influence clinical outcomes in patients with community-acquired pneumonia. *Chest* 133:618–24
16. Song JH, Jung SI, Ki HK, et al (2004) Clinical outcomes of pneumococcal pneumonia caused by antibiotic-resistant strains in Asian countries: a study by the Asian network for surveillance of resistant pathogens. *Clin Infect Dis* 38:1570–78
17. Brouwer MC, de Gans J, Heckenberg SGB, et al (2009) Host genetic susceptibility to pneumococcal and meningococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 9:31–44
18. Jonsson G, Truedsson L, Sturfelt G, et al (2005) Hereditary C2 deficiency in Sweden: frequent occurrence of invasive infection, atherosclerosis, and rheumatic disease. *Medicine (Baltimore)* 84:23–34
19. Medvedev EA, Lentschat A, Kuhns DB, et al (2003) Distinct mutations in IRAK-4 confer hyporesponsiveness to lipopolysaccharide and interleukin-1 in a patient with recurrent bacterial infections. *J Exp Med* 198:521–31
20. Picard C, Puel A, Bonnet M, et al (2003) Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. *Science* 299:2076–79
21. Enders A, Pannicke U, Berner R, et al (2004) Two siblings with lethal pneumococcal meningitis in a family with a mutation in interleukin-1 receptor-associated kinase 4. *J Pediatr* 145:698–700
22. Ku CI, von Bernuth H, Picard C, et al (2007) Selective predisposition to bacterial infections in IRAK-4-deficient children: IRAK-4-dependent TLRs are otherwise redundant in protective immunity. *J Exp Med* 204:2407–22
23. Döffinger R, Smahi A, Bessia C, et al (2001) X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency is caused by impaired NF- $\kappa$ B signaling. *Nat Genet* 27:277–85
24. Moens L, Verhaegen J, Pierik M, et al (2007) Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 polymorphism in invasive pneumococcal disease. *Microbes Infect* 9:15–20
25. Khor CC, Chapman SJ, Vannberg FO, et al (2007) A Mal functional variant is associated with protection against invasive pneumococcal disease, bacteremia, malaria and tuberculosis. *Nat Genet* 39:523–28
26. Chapman SJ, Khor CC, Vannberg FO, et al (2007) I $\kappa$ B genetic polymorphisms and invasive pneumococcal disease. *Am J Respir Crit Care Med* 176:181–87
27. Yuan FF, Marks K, Wong M, et al (2008) Clinical relevance of TLR2, TLR4, CD14 and Fcy RIIA gene polymorphisms in *Streptococcus pneumoniae* infection. *Immunol Cell Biol* 86:268–70
28. Yee AM, Phan HM, Zuniga R, et al (2000) Association between FcyRIIa-R131 allotype and bacteremic pneumococcal pneumonia. *Clin Infect Dis* 30:25–8
29. Yuan FF, Wong M, Pereva N, et al (2003) FcyRIIA polymorphisms in *Streptococcus pneumoniae* infection. *Immunol Cell Biol* 81:192–95
30. Moens L, Van Hoeyveld E, Verhaegen J, et al (2006) Fcy-receptor IIA genotype and invasive pneumococcal infection. *Clin Immunol* 118:20–3
31. Roy S, Knox K, Segal S, et al (2002) MBL genotype and risk of invasive pneumococcal disease; a case-control study. *Lancet* 359:1569–73
32. Kronborg G, Weis N, Madsen HO, et al (2002) Variant mannose-binding lectin alleles are non associated with susceptibility to or outcome of invasive pneumococcal infection in randomly included patients. *J Infect Dis* 185:1517–20
33. Moens L, Van Hoeyveld E, Peetermans WE, et al (2006) Mannose binding lectin genotype and invasive pneumococcal infection. *Hum Immunol* 67:605–11
34. Shaaf BM, Boehmke F, Esnaashari H, et al (2003). Pneumococcal septic shock is associated with the interleukin-10-1082 gene promoter polymorphism. *Am J Respir Crit Care Med* 168(4):476–80
35. Schaaf B, Rupp J, Muller-Steinhardt M, et al (2005) The interleukin-6-174 promoter polymorphism is associated with extrapulmonary bacterial dissemination in *Streptococcus pneumoniae* infection. *Cytokine* 31:324–28
36. Roy S, Hill AV, Knox K, Griffiths D, Crook D (2002) Research pointer: association of common genetic variant with susceptibility to invasive pneumococcal disease. *BMJ* 324:1369
37. Chapman SJ, Khor CC, Vannberg FO, et al (2006) PTPN22 and invasive bacterial disease. *Nat Genet* 38:499–500
38. Chapman SJ, Vannberg FO, Khor CC, et al (2007) Functional polymorphism in the *FCN2* gene are not associated with invasive pneumococcal disease. *Mol Immunol* 44:3267–70
39. Yende S, Angus DC, Kong L, et al (2009) The influence of macrophage migration inhibitory factor gene polymorphisms on outcome from community-acquired pneumoniae. *FASEB J* 23:2403–11
40. Bédos JP, Rolin O, Bouanchaud DH, Pocard JJ (1991) Relationship between virulence and resistance to antimicrobial in pneumococci. Contribution of experimental data obtained in animal model. *Pathol Biol (Paris)* 39:984–90
41. Briles DE, Crain MJ, Gray BM, et al (1992) Strong association between capsular type and virulence for mice among human isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 60:111–6
42. Martens P, Worm SW, Lundgren B, et al (2004) Serotype-specific mortality from invasive *Streptococcus pneumoniae* disease revisited. *BMC Infectious Diseases* 4:21
43. Brueggemann AB, Griffiths DT, Meats E, et al (2003) Clonal relationship between invasive and carriage *Streptococcus pneumoniae* and serotype and clone specific differences in invasive disease potential. *J infect Dis* 187:1424–32
44. Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW (2008) The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nature Rev Microbiol* 6:288–301
45. Wood WB (1949) The inhibition of surface phagocytosis by the capsule “slime layer” of pneumococcus type III. *J Exp Med* 90:85–96

46. Watson DA, Muscher DM, Verhoef J (1995) Pneumococcal virulence factor and immune responses to them. *Eur Microbiol Infect Dis* 14:479–90
47. Bergmann S, Hammerschmidt S (2006) Versatility of pneumococcal surface proteins. *Microbiology* 152:295–303
48. Moxon ER, Kroll JS (1990) The role of bacterial polysaccharide capsules as virulence factors. *Curr Top Microbiol Immunol* 150:65–86
49. Wilkelstein JA (1981) The role of complement in the host's defense against *Streptococcus pneumoniae*. *Rev Infect Dis* 3:289–98
50. Musher DM (1992) Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity and treatment. *Clin Infect Dis* 14:801–7
51. Abeyta M, Hardy GG, 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* 17:218–25
52. Fine DP (1975) Pneumococcal type-associated variability in alternate complement pathway activation. *Infect Immun* 12:772–8
53. Hostetter MK, Krueger RA, Schmeling DJ (1984) The biochemistry of opsonization: central role of the reactive thiolester of the third component of complement. *J Infect Dis* 150:653–61
54. Van Dam JE, Fler A, Snippe H (1990) Immunogenicity and immunochemistry of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharides. *Infect Immun* 59:2750–7
55. Fernebro J, Andersson I, Sublett J, et al (2004) Capsular expression in *Streptococcus pneumoniae* negatively affects spontaneous and antibiotic induced lysis and contributes to antibiotic tolerance. *J Infect Dis* 189:328–38
56. Cundell DR, Gerard NP, Gerard C, et al (1995) *Streptococcus pneumoniae* anchor to activate human cells by receptor for platelet activating factor. *Nature* 377:435–8
57. Ring A, Weiser JN, Tuomanen EI (1998) Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway. *J Clin Invest* 102:347–60
58. De La Rivas B, Garcia JL, Lopez R, Garcia P (2001) Molecular characterization of the pneumococcal teichoic acid phosphorylcholine esterase. *Microb Drug Resist* 7:213–22
59. Vollmer W, Tomasz A (2001) Identification of the teichoic acid phosphorylcholine esterase in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 39:1610–22
60. Wartha F, Beiter K, Albiger B, et al (2007) Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. *Cell Microbiol* 1162:1171
61. Kovacs M, Halfmann A, Fedtke I, et al (2006) A functional dlt operon, encoding proteins required for incorporation of d-alanine in teichoic acids in Gram-positive bacteria, confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 188:5797–805
62. Hammerschmidt S (2006) Adherence molecules of pathogenic pneumococci. *Current Opinion in Microbiology* 9:12–20
63. Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW (2008) The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol* 6:288–301
64. Mitchell AM, Mitchell TJ (2010) *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. *Clin Microb Infect* 16:411–8
65. Lock RA, Zhang QY, Berry AM, Paton JC (1996) Sequence variation in the *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin gene affecting haemolytic activity and electrophoretic mobility of the toxin. *Infect Immun* 21:71–83
66. Kirkham LA, Jefferies JM, Kerr AR, et al (2006) Identification of invasive serotype 1 pneumococcal isolates that express nonhemolytic pneumolysin. *J Clin Microbiol* 44:155–9
67. Tilley S, Orlova E, Gilbert R, et al (2005) Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. *Cell* 121:247–56
68. Hirst R, Kadioglu A, O'Callaghan C, Andrew P (2004) The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. *Clin Exp Immunol* 138:195–201
69. Kadioglu A, Coward W, Colston M, et al (2004) CDA-T-lymphocyte interactions with pneumolysin and pneumococci suggest a crucial protective role in the host response to pneumococcal infection. *Infect Immun* 72:2689–97
70. Mitchell TJ, Andrew PW, Saunders FK, et al (1991) Complement activation and antibody binding by pneumolysin via a region homologous to a human acute phase protein. *Mol Microbiol* 5:1883–8
71. Rubins JB, Charboneau D, Fasching C, et al (1996) Distinct roles for pneumolysin's cytotoxic and complement activities in the pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 153:1339–46
72. Alexander JE, Berry AM, Paton JC, et al (1998) Amino acid changes affecting the behavior of pneumococci in pneumonia. *Microb Pathog* 24:167–74
73. Jounblat R, Kadioglu A, Mitchell T, Andrew P (2003) Pneumococcal behaviour and host responses during bronchopneumonia are affected differently by the cytolytic and complement-activating activities of pneumolysin. *Infect Immun* 71:1813–19
74. Malley R, Henneke P, Morse SC, et al (2003) Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:1966–971
75. Baba H, Kawamura I, Kohda C, et al (2002). Induction of gamma interferon and nitric oxide by truncated pneumolysin that lacks pore-forming activity. *Infect Immun* 70:107–13
76. Berry AM, Alexander JE, Mitchell TJ, et al (1995) Effect of defined point mutations in the pneumolysin gene on the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 63:1969–74
77. Canvin JR, Marvin AP, Sivakumaran M, et al (1995) The role of pneumolysin and autolysin in the pathology of pneumonia and septicaemia in mice infected with a type 2 pneumococcus. *J Infect Dis* 172:119–23
78. Alexander JE, Lock RA, Peeters CC, et al (1994) Immunization of mice with pneumolysin toxoid confers a significant degree of protection against at least nine serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 62:5683–8
79. Kadioglu A, Taylor S, Iannelli F, et al (2002) Upper and lower respiratory tract infection by *Streptococcus pneumoniae* is affected by pneumolysin deficiency and differences in capsule type. *Infect Immun* 70:2886–90
80. Orihuela CJ, Gao GL, Francis KP, Yu J (2004) Tuomanen EI. Tissue-specific contributions of pneumococcal virulence factors to pathogenesis. *J Infect Dis* 190:1661–9
81. Berry AM, Yother J, Briles DE, et al (1989) Reduced virulence of a defined pneumolysin-negative mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 57:2037–42
82. Berry AM, Ogunniyi AD, Miller DC, Paton JC (1999) Comparative virulence of *Streptococcus pneumoniae* strains with insertion-duplication, point, and deletion mutations in the pneumolysin gene. *Infect Immun* 67:981–5
83. Kadioglu A, Gingles NA, Grattan K, et al (2000) Host cellular immune response to pneumococcal lung infection in mice. *Infect Immun* 68:1557–62
84. Benton KA, Everson MP, Briles DE (1995) A pneumolysin negative mutant of *Streptococcus pneumoniae* causes chronic bacteraemia rather than acute sepsis in mice. *Infect Immun* 63:448–55
85. Shelburne SA, Davenport MT, Keith DB, Musser JM (2008) The role of complex carbohydrate catabolism in the pathogenesis of invasive streptococci. *Trends in Microbiol* 16:318–25
86. Orihuela CJ, Radin JN, Sublett JE, et al (2004) Microarray analysis of pneumococcal gene expression during invasive disease. *Infect Immun* 72:5582–96
87. Iyer R, Camilli A (2007) Sucrose metabolism contributes to in vivo fitness of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 66:1–13

88. Abbott DW, Higgins MA, Hyrnuik S, et al (2010) The molecular basis of glycogen breakdown and transport in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microb* 77:183–199
89. Lammerts van Bueren A, Higgins M, Wang D, et al (2007) Identification and structural basis of binding to host lung glycogen by streptococcal virulence factors. *Nat Struct Mol Biol* 14:76–84
90. King SJ, Hippe KR, Gould J, Bae D, et al (2004) Phase variable desialylation of host proteins that bind to *Streptococcus pneumoniae* in vivo and protect the airway. *Mol Microbiol* 54:159–71
91. King SJ, Hippe KR, Weiser JN (2006) Deglycosylation of human glycoconjugates by the sequential activities of exoglycosidases expressed by *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 59:961–74
92. Burnaugh AM, Frantz LJ, King SJ (2008) Growth of *Streptococcus pneumoniae* on human glycoconjugates is dependent upon the sequential activity of bacterial exoglycosidases. *J Bacteriol* 190:221–30
93. Stephenson K, Hoch JA (2002) Two-component and phosphorelay signal-transduction systems as therapeutic targets. *Current Opinion in Pharmacology* 2:507–12
94. Throup JP, Koretke KK, Bryant AP, et al (2000) A genomic analysis of two-component signal transduction in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 35:566–76
95. MA Z, Zhang JR (2007) RR06 activates transcription of spr1996 and cbpA in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 189:2497–509
96. McCluskey J, Hinds J, Husain S, et al (2004) A two-component system that controls the expression of pneumococcal surface antigen A (PsaA) and regulates virulence and resistance to oxidative stress in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 51:1661–75
97. Tettelin H, Nelson KE, Paulsen IT, et al (2001) Complete genome sequence of a virulente isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* 293:498–506
98. Lanie JA, Ng WL, Kazmierczak KM, et al (2007) Genome sequence of Avery's virulent serotype 2 strain D39 of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with that of unencapsulated laboratory strain R6. *J bacterial* 189:38–51
99. Obert C, Sublett J, Kaushal D, et al (2006) Identification of a candidate *Streptococcus pneumoniae* core genome and regions of diversity correlated with invasive pneumococcal disease. *Infect Immun* 74:4766–77
100. Hava DL, Camilli A (2002) Large-scale identification of serotype 4 *Streptococcus pneumoniae* virulence factors. *Mol Microbiol* 45:1839–406
101. Orihuela CJ, Radin JN, Sublett JE, et al (2004) Microarray analysis of pneumococcal gene expression during invasive disease. *Infect Immun* 72:5582–96
102. William SP, Tait-Kamradt AG, Norton JE, et al (2007) Nucleotide sequence changes between *Streptococcus pneumoniae* R6 and D39 strains determined by oligonucleotide hybridization DNA sequencing neurology. *J Microbiol methods* 70:65–74
103. Bijlsma JJ, Burghout P, Kloosterman TG, et al (2007) Development of genomic array footprinting for identification of conditionally essential genes in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl environ Microbiol* 73:1514–24
104. Weiser J, Austrian R, Sreenivasan PK, Masure H (1994) Phase variation in pneumococcal opacity: relationship between colonial morphology and nasopharyngeal colonization. *Infect Immun* 62:2582–9
105. Oggioni MR, Trappetti C, Kadioglu A, et al (2006) Switch from planktonic to sessile life: a major event in pneumococcal pathogenesis. *Mol Microbiol* 61:1196–210
106. Van Der Poll T, M Opal S (2008) Host pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect Dis* 8:32–43
107. Gordon SB, Irving GR, Lawson RA, et al (2000) Intracellular trafficking and killing of *Streptococcus pneumoniae* by human alveolar macrophages are influenced by opsonins. *Infect Immun* 68: 2286–93
108. Dockrell DH, Marriott HM, Prince LR, et al (2003) Alveolar macrophage apoptosis contributes to pneumococcal clearance in resolving model of pulmonary infection. *J Immunol* 171:53–80–88
109. Kadioglu A, Coward W, Colston M, et al (2004) CD4-T-lymphocyte interactions with pneumolysin and pneumococci suggest a crucial protective role in the response to pneumococcal infection. *Infect Immun* 72:2689–97
110. Kawakami K, Yamamoto N, Kinjo Y, et al (2003) Critical role of Valpha 14+ natural killer T cells in the innate phase of host protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Eur J Immunol* 33:3322–30
111. Bals R, Hiemstra PS (2004) Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogen. *Eur Respir J* 23:327–33
112. Knapp S, Weiland CW, Van t Veer C, et al (2004) Toll-like receptor 2 plays a role in the early inflammatory response to murine pneumococcal pneumoniae but does not contribute to antibacterial defense. *J Immunol* 172:3132–38
113. Malley R, Henneke P, Morse SC, et al (2003) Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:1966–71
114. Albiger B, Dahlberg S, Sandgren A, et al (2007) Toll-like receptor 9 acts at an early stage in host defence against pneumococcal infection. *Cell Microbiol* 9:633–44
115. Xu F, Droemann D, Rupp J, et al (2008) Modulation of the inflammatory response to *Streptococcus pneumoniae* in a model of acute lung tissue infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 39:522–9
116. Von Bermuth H, Picard C, Zhongbo J, et al (2008) Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science* 321:691–96
117. Ku CI, von Bermuth H, Picard C, et al (2007) Selective predisposition to bacterial infections in IRAK-4-deficient children: IRAK-4-dependent TLRs are otherwise redundant in protective immunity. *J Exp Med* 204:2407–22
118. Dessing MC, Knapp S, Florquin S, et al (2007) CD14 facilitates invasive respiratory tract infection by *Streptococcus pneumoniae*. *Am J Respir Crit Care Med* 175:604–11
119. Koppel EA, Litjens M, van den Berg VC, et al (2008) Interaction of SIGNR1 expressed by marginal zone macrophages with marginal zone B cells is essential to early IgM responses against *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Immunol* 45:2881–87
120. van der Poll T, M Opal S (2009) Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet* 374:1543–56
121. van der Poll T, Keogh CV, Buurman WA, Lowry SF (1997) Passive immunization against tumor necrosis factor-alpha impairs host defense during pneumococcal pneumonia in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 155:603–08
122. van der Poll T, Keogh CV, Guirao X, et al (1997) Interleukin-6 gene-deficient mice show impaired defense against pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis* 176:439–44
123. van der Sluijs KF, van Elden LJ, Nijhuis M, et al (2004) IL-10 is an important mediator of the enhanced susceptibility to pneumococcal pneumonia after influenza infection. *J Immunol* 172:7603–09
124. Rubins JB, Pomeroy C (1997) Role of gamma interferon in the pathogenesis of bacteremic pneumococcal pneumoniae. *Infect Immun* 65:2975–77
125. Mohler J, Azoulay-Dupuis E, Amory-Rivier C, et al (2003) *Streptococcus pneumoniae* stain-dependent lung inflammatory responses in a murine model of pneumococcal pneumonia. *Intensive Care Med* 29(5):808–16