



HAL
open science

**Caractérisation d'une forme extracellulaire soluble de la
protéase PrtS chez Streptococcus thermophilus 4F44.
Mise en évidence et détermination de ses sites de
coupure sur les caséines**

Oun Ki Chang

► **To cite this version:**

Oun Ki Chang. Caractérisation d'une forme extracellulaire soluble de la protéase PrtS chez Streptococcus thermophilus 4F44. Mise en évidence et détermination de ses sites de coupure sur les caséines. Sciences agricoles. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2011. Français. NNT : 2011INPL065N . tel-01749448

HAL Id: tel-01749448

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749448v1>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires

Ecole doctorale Science et Ingénierie des Ressources, Procédés, Produits, Environnement

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Institut National Polytechnique de Lorraine

Discipline : Sciences Agronomiques

Soutenue publiquement le 26 octobre 2011

par

Oun Ki CHANG

Caractérisation d'une forme extracellulaire soluble

de la protéase PrtS chez *Streptococcus thermophilus* 4F44

Mise en évidence et détermination de ses sites de coupure sur les caséines.

Membres du jury

Rapporteurs :

Mr Jean-Marc CHOBERT, Directeur de Recherches, INRA, Nantes

Mr Jean-Luc GAILLARD, Professeur des Universités, Université Caen-Basse Normandie

Examineurs :

Mme Annie DARY, Professeur des Universités, Nancy-Université (Directrice de thèse)

Mr Pascal DEGRAEVE, Professeur des Universités, Université de Lyon 1

Mr Gérard HUMBERT, Ingénieur de Recherches, Nancy-Université (Directeur de thèse)

Mme Clarisse PERRIN, Maître de Conférences, Nancy-Université

Avant-Propos

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe Protéolyse et Biofonctionnalités des Protéines et des Peptides de l'Unité de Recherche Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux. Je tiens à remercier le Pr. Guido Rychen, directeur d'unité pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Je remercie chaleureusement le Pr. Annie Dary, Directrice de ma thèse de m'avoir accueilli au sein de son équipe et de m'avoir donné les moyens de réaliser ce travail dans de bonnes conditions.

Je tiens tout particulièrement à remercier le Dr. Gérard Humbert pour m'avoir aidé à venir à Nancy pour préparer une thèse, de m'avoir soutenu le long de ces années et d'avoir dirigé ce travail.

Un grand merci au Dr. Clarisse Perrin pour m'avoir accordé sa disponibilité et supporté pendant ces années. De plus, je tiens également à la remercier pour m'avoir permis d'approfondir différentes techniques et connaissances qui me serviront dans ma future carrière, je l'espère.

Mes remerciements s'adressent également aux rapporteurs et membres de la commission d'examen qui me font l'honneur de juger ce travail :

Monsieur Jean-Marc CHOBERT	Directeur de Recherche, INRA, Nantes
Monsieur Pascal DEGRAEVE	Professeur des Universités, Université Claude Bernard, Lyon
Monsieur Jean-Luc GAILLARD	Professeur des Universités, Université Caen-Basse Normandie

Merci à Franck Saulnier pour tout ce qu'il a fait pour la réussite de cette thèse.

Je tiens à remercier le Dr. Alain Driou pour ses suggestions et sa gentillesse.

Merci aux Dr. Jean-Michel Girardet et Laurent Miclo pour leurs aides et conseils techniques.

Je remercie aussi mes collègues de bureau, Aurélie, Delphine et Emilie pour leurs amitiés et gentillesse.

Merci à tous les membres de l'équipe PB2P Anne, Catherine, Céline, Chantal, Christiane, Emeline, Katy, Lynn, Magali, et Yvonne.

Merci à Wessam, tout nouveau Docteur, avec qui j'ai débuté ce travail, je te remercie de m'avoir guidé et aidé très souvent. Notre article est accepté, Champagne.

Merci à Faïza, François, Hamed, Maira, Nawara, Nazir, Xavier et Zeeshan, mes collègues thésards, pour leur soutien au quotidien et leur bonne humeur. Cela fut un plaisir de travailler à vos côtés.

Je tiens à remercier le Pr. Bou Oung Lee, mon ancien directeur en Corée, pour m'avoir donné la chance d'étudier en France et mes collègues du laboratoire "milk processing" de Corée.

Merci à mes amies coréennes pour avoir communiqué avec moi afin de m'aider à vaincre la nostalgie.

Le plus important, ma famille, je remercie mes parents, mon frère, ma sœur et mon beau-frère pour leurs soutien et encouragements lors de ces longues années d'études.

Enfin, merci à Dieu, Jésus Christ, pour m'avoir guidé au cours de mes études.

Liste des abréviations

ACN : Acétonitrile

ACTH : hormone adrénocorticotrope

AN : Anchor domain (Domaine d'Ancrage)

BCAA : Branched chain amino acids

CEP : Cell envelope proteinase

Da : Dalton

ECA : Enzyme de conversion de l'angiotensine

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid (acide éthylène diamine tetra acétique)

EF : Facteur d'élongation

ESI : Electrospray ionisation

ESPCI : Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielle de la ville de Paris

FT-ICR : Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance

GAS : Group A streptococci

Gbp : Glucan binding protein

GBS : Group B streptococci

GI : GenInfo identifiant

Gsp : General stress protein

IEF : Isoélectrofocalisation

ITS : Internal transcribe sequence

kDa : kiloDalton

LTQ : Linear trap quadrupole (type trappe linéaire)

m/z : Masse sur charge

MALDI : Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation

MLST : Multilocus Sequence Typing

MS : Mass spectrometry

NCBI : National Center for Biotechnology Information

ORF : Open Reading Frame

OPP : Oligo-Peptide-Permease

PAGE-SDS : Électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium.

PAGE-Urée : Électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence d'Urée

PGK : Phosphoglycérate kinase

PrtS : Protéase de *S. thermophilus*

PVDF : Polyfluorure de vinylidène

Q-TOF : Quadrupole Time of Flight

RBS : Site de fixation du ribosome

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RP-HPLC : High Performance Liquid Chromatography

SIM : Selected Ion Monitoring

SMBP : Spectrométrie de Masse Biologique et Protéomique de l'ESPCI

SodA : Superoxide dismutase

SpeB : Streptococcal pyogenic exotoxin B

TAE : Tris-acétate-EDTA

TCA : Trichloroacetic acid

TFA : Trifluoroacetic acid

TOF : Time of Flight.

Sommaire

Avant-Propos	3
Liste des abréviations	5
Liste des figures	13
Liste des tableaux	17
Introduction bibliographique	21
1. Place de <i>Streptococcus thermophilus</i> au sein du genre <i>Streptococcus</i>	23
2. Adaptation de <i>S. thermophilus</i> à l'environnement lait	28
2.1. Caractéristiques de <i>S. thermophilus</i>	28
2.2. Evolution génomique de <i>Streptococcus thermophilus</i>	29
2.2.1. Gènes inactivés chez <i>S. thermophilus</i> : pseudogènes.....	29
2.2.2. Absence de gènes liés à la virulence	31
2.2.3. Transferts horizontaux de gènes.....	32
3. Système protéolytique chez <i>S. thermophilus</i>	34
3.1. Système de transport	35
3.1.1. Système de transport modèle Opp.....	35
3.1.2. Système de transport chez <i>Streptococcus thermophilus</i>	36
3.2. Peptidases intracellulaires.....	39
3.3. Protéase de paroi	41
3.3.1. Caractéristiques de la protéase PrtS	41
3.3.2. Protéases homologues à PrtS trouvées chez d'autres streptocoques pathogènes.....	52
3.3.3. SspA : protéase homologue à PrtS de <i>Streptococcus suis</i>	52
4. Ancrage de la protéase PrtS à la paroi	53
4.1. Sortases	55
4.2. Sortase A.....	56
4.2.1 Structure du peptidoglycane.....	56
4.2.2. Protéines à ancrer au peptidoglycane	56
4.2.3. La sortase A chez <i>S. thermophilus</i>	59
4.3. Structure de la sortase A et mécanisme réactionnel	59
4.4. Localisation de la sortase au niveau membranaire.....	60
4.5. Rôle de la sortase A chez différents streptocoques.....	60
4.5.1. <i>Streptococcus pyogenes</i>	60
4.5.2. Streptocoques oraux	60
4.5.3. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	61
4.5.4. Autres streptocoques	61
4.6. Inactivation de la sortase	61
Objectifs du travail :	63
Matériels et Méthodes	65
1. Souches bactériennes et conditions de culture	67
2. Extraction de PrtS de la paroi des bactéries	67
3. Récupération des surnageants de milieux de culture	71
4. Obtention de la fraction enrichie en enzyme PrtS soluble	71

4.1. Dessalage par chromatographie sur Sephadex G-25.	71
4.2. Centrifugation sur module filtrant	71
4.3. Enrichissement de la fraction enzymatique sous l'effet du pH.....	71
5. Mise en évidence et mesure de l'activité enzymatique.....	74
5.1. Mise en évidence de l'activité protéasique par zymographie.....	74
5.2. Mise en évidence et mesure de l'activité à l'aide de substrats synthétiques	74
6. Méthodes électrophorétiques des protéines	75
6.1. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium (PAGE-SDS).....	75
6.2. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence d'urée (PAGE-Urée).....	75
6.3. Electrophorèse bidimensionnelle.....	76
6.3.1. IEF.....	76
6.3.2. PAGE-SDS pour PAGE-2D	76
6.4. Electrotransfert de protéines	77
7. Microséquençage protéique N-terminal selon Edman.....	77
8. Hydrolyse des caséines par PrtS libre	77
9. Chromatographie liquide haute performance en phase inversée (RP-HPLC) sur colonne C18 analytique.....	78
10. Analyse par spectrométrie de masse des protéines et des peptides	79
10.1. Analyse des hydrolysats de caséine	79
10.2. Analyse de la protéine PrtS par la technique du "Bottom-Up"	80
10.2.1. MALDI-TOF des peptides tryptiques de PrtS	80
10.2.2. ESI-FT-ICR MS/MS des peptides tryptiques de PrtS	81
11. Analyse de séquences des gènes <i>prtS</i> et <i>srtA</i>.....	81
11.1. Extraction d'ADN et séparation des fragments de restriction	81
11.2. PCR (Réaction en Chaîne par la Polymérase) et séquençage d'ADN	82
11.2.1. Amplification par PCR.....	82
11.2.1. Séquençage des produits amplifiés	83
11.2.2. Séparation des amplicons par électrophorèse en gel d'agarose	84
Résultats	85
Partie I.....	87
Identification et caractérisation d'une enzyme protéolytique libre dans le milieu de culture de <i>Streptococcus thermophilus</i>	87
1. Mise en évidence d'une activité protéolytique libre chez la souche 4F44.	88
1.1. Recherche d'une activité protéolytique libre chez la souche PB385	88
1.2. Recherche d'une activité protéolytique libre chez les 30 souches de la collection du laboratoire.....	88
2. Evaluation des activités enzymatiques sur substrats synthétiques.....	92
2.1. Recherche des activités enzymatiques sur substrats synthétiques dans les milieux intra- et extra-cellulaires de différentes souches de <i>S. thermophilus</i>	92
2.2 Absence de libération de la protéase.....	92
2.3. Suivi de l'activité protéolytique libre au cours de la croissance de la souche 4F44	93

3. Caractérisation de la protéase libre de <i>S. thermophilus</i> 4F44	96
3.1. Récupération d'une fraction enrichie en protéase libre	96
3.2. Détermination de la séquence amino-terminale de la protéase	96
3.3. Détermination de la séquence du gène <i>prtS</i> chez <i>S. thermophilus</i> 4F44.....	100
3.4. Détermination de la séquence protéique à partir du gène <i>prtS</i> de <i>S. thermophilus</i> 4F44	104
3.5. Proportion de l'activité PrtS libre et ancrée chez <i>S. thermophilus</i> 4F44.....	113
Partie II	115
Recherche des causes de la libération de la protéase PrtS de <i>Streptococcus thermophilus</i> 4F44115	
1. Vérification de l'efficacité de la sortase A chez différentes souches de <i>S. thermophilus</i>.....	116
1.1. Détermination de la séquence du gène <i>srtA</i> chez différentes souches de <i>S. thermophilus</i>	116
1.2. Comparaison de séquences protéiques SrtA de diverses souches de <i>S. thermophilus</i>	119
1.3. Comparaison de séquences protéiques SrtA de différentes souches de <i>S. thermophilus</i> et espèces de streptocoques.....	119
2. Mise en évidence de la séquence consensus du domaine d'ancrage dans la région C-terminale de la protéine PrtS libre.....	124
2.1. Détermination des masses des peptides tryptiques de PrtS par spectrométrie MALDI-TOF.....	126
2.2 Détermination des masses des peptides tryptiques de PrtS par spectrométrie ESI-FT-ICR	126
3. Recherche d'autres protéines extracellulaires libérées dans le milieu	129
3.1. Analyse <i>in silico</i> des protéines libérées dans le milieu.....	129
3.2. Identification des protéines libérées dans le milieu extracellulaire de la souche 4F44.....	129
Partie III.....	133
Etude de la spécificité de coupure d'une fraction enrichie contenant la protéase PrtS sur les caséines bovines	133
1. Evaluation de l'hydrolyse des caséines α_{s1} et β en mélange par une fraction enrichie de PrtS libre de <i>S. thermophilus</i> 4F44	134
1.1. Suivi de l'hydrolyse par RP-HPLC.....	134
1.2. Caractérisation des peptides issus de l'hydrolyse des caséines α_{s1} et β par PrtS par spectrométrie de masse.....	134
2. Hydrolyse de protéines laitières par le surnageant de culture de <i>S. thermophilus</i> 4F44	138
2.1. Suivi par RP-HPLC de l'hydrolyse de la caséine entière.....	140
2.2. Hydrolyse des protéines lactosériques par RP-HPLC.	142
2.3. Caractérisation des peptides issus de la caséinolyse	143
2.3.1. Comparaison du nombre et de la taille des peptides entre 1 h et 4 h d'hydrolyse	143
2.3.2. Comparaison du nombre et de la taille des peptides entre 4 h et 22 h d'hydrolyse	143
2.4. Spécificité de coupure de la protéase PrtS libre	163
2.4.1. Comparaison des sites de coupure observés avec ceux du fragment 1-23 et de la caséine α_{s1} obtenus avec d'autres protéases de bactéries lactiques.....	163
2.4.2. Spécificité de coupure de la protéase PrtS libre déduite des peptides issus de l'hydrolyse de la caséine entière.....	165
2.5. Peptides à activité biologique libérés à partir de caséines par PrtS de <i>S. thermophilus</i>	176

2.5.1. Peptides à activité biologique issus de l'hydrolyse de la caséine β par PrtS	177
2.5.2. Peptides à activité biologique issus de l'hydrolyse de la caséine α_{s1} par PrtS.....	177
2.5.3. Peptides à activité biologique issus de l'hydrolyse de la caséine α_{s2} par PrtS.....	179
Discussion.....	183
Identification et caractérisation d'une forme soluble d'une activité protéolytique pour <i>S. thermophilus</i> 4F44	184
1. Recherche d'une activité protéolytique extracellulaire chez différentes souches de <i>S. thermophilus</i>.....	185
2. Mise en évidence des formes non mature et mature de la protéase PrtS libre dans le surnageant de culture de <i>S. thermophilus</i> 4F44.....	187
3. Le rôle de la sortase dans la libération de la protéase	189
4. Identification de protéines excrétées dans le surnageant de culture de <i>S. thermophilus</i>	190
5. Caractérisation de l'extrémité C-terminale de la protéase PrtS libre.....	192
6. Hydrolyse de la caséine entière par PrtS libre de <i>S. thermophilus</i> 4F44.....	192
6.1. Sensibilité des caséines à l'hydrolyse par PrtS.....	192
6.2. Spécificité de coupure de PrtS	194
6.3. Recherche dans les hydrolysats de peptides à activité biologique	195
Conclusions et Perspectives	199
Références Bibliographiques.....	203
Liste des travaux.....	222

Liste des figures

Figure 1. Relations phylogénétiques de 55 espèces de <i>Streptococcus</i> basées sur la séquence du gène de l'ARN 16S (Facklam, 2002).....	25
Figure 2. Organisation génétique de la région chromosomique entourant l'îlot <i>prtS</i> chez <i>Streptococcus thermophilus</i> (LMD-9, JIM8232, CNRZ1447, CNRZ1066, et LMG18311) et <i>Streptococcus suis</i> (Delorme <i>et al.</i> , 2010).....	33
Figure 3. Représentation schématique du système protéolytique chez <i>Streptococcus thermophilus</i> d'après Garault <i>et al.</i> (2002) et Monnet (2006).	35
Figure 4. Modèle de transport d'oligopeptides (Opp) chez les bactéries Gram ⁺ (Doeven <i>et al.</i> , 2008).	36
Figure 5. Représentation schématique du système de transport Ami chez <i>Streptococcus thermophilus</i>	37
Figure 6. Organisation génétique des gènes <i>amiA</i> chez <i>Streptococcus thermophilus</i> (Garault <i>et al.</i> , 2002).....	38
Figure 7. Représentation schématique des CEPs "cell envelope proteases" de différentes bactéries lactiques.....	42
Figure 8. Schéma du mécanisme de libération de la protéase de <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i>	45
Figure 9. Comparaison des extrémités C-terminales des protéases de type Prt de différentes bactéries (<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i>).	46
Figure 10. Représentation schématique de la structure de la protéase PrtS.	49
Figure 11. Spécificités de coupure de protéases Prt de bactéries lactiques sur le fragment (1-23) de la caséine α_{S1}	51
Figure 12. Différents modes de fixation de protéines de surface chez des bactéries à Gram ⁺ (Cossart et Jonquières, 2000).....	54
Figure 13. Synthèse du peptidoglycane chez <i>Staphylococcus aureus</i> (Marraffini <i>et al.</i> , 2006).	57
Figure 14. Voie d'excrétion et d'ancrage à la paroi cellulaire des protéines de surface des bactéries à Gram ⁺ par la sortase A (Marraffini <i>et al.</i> , 2006).....	58
Figure 15. Protocole d'extraction de la fraction protéolytique pariétale de <i>Streptococcus thermophilus</i>	70
Figure 16. Représentation schématique de la concentration des protéines extracellulaires (dont la protéase) par ultrafiltration au seuil de coupure de 50 kDa (Microcon).	72
Figure 17. Représentation schématique de l'obtention des fractions enrichies en enzyme PrtS libre utilisées :	73

Figure 18. Recherche d'activité protéolytique dans le surnageant de culture centrifugé (2 x 3900 g pendant 15 min) puis filtré (F) ou non filtré (NF) de la souche de <i>Streptococcus thermophilus</i> PB385 cultivée en milieu M17 pendant 4 h à 42°C.	89
Figure 19. Recherche par zymographie d'une activité caséinolytique extracellulaire dans les surnageants de milieu de culture de souches de <i>Streptococcus thermophilus</i>	90
Figure 20. Mise en évidence par zymographie des activités caséinolytiques présentes dans le milieu de culture centrifugé à 3900 g pendant 15 min, filtré ou non (0,45 µm), dans les contenus intracellulaires et dans la fraction enzymatique pariétale de <i>Streptococcus thermophilus</i> 4F44.	91
Figure 21. Evolution de l'activité enzymatique soluble en fonction du temps de croissance (suivi par mesure de la densité optique à 650 nm) de la souche 4F44 en milieu M17 (A) et en fonction de l'acidification du milieu (B).	94
Figure 22. Influence du pH du milieu de croissance de la souche 4F44, sur l'activité enzymatique soluble. Révélation de l'activité caséinolytique par zymographie.	95
Figure 23. Détermination de la masse moléculaire apparente de la protéase soluble de la souche 4F44.	97
Figure 24. Profil électrophorétique bidimensionnel de la fraction enrichie en enzyme pour la détermination du point isoélectrique de la protéase soluble de la souche 4F44.	98
Figure 25. Profils électrophorétiques des protéines extraites du milieu de culture de <i>Streptococcus thermophilus</i> 4F44 (cultivée 6 h à 42°C en milieu M17) et alignements des séquences obtenues avec la séquence de la protéine PrtS de <i>S. thermophilus</i> LMD-9.	99
Figure 26. Séquence nucléotidique obtenue après séquençage de la région codant la protéase PrtS de <i>Streptococcus thermophilus</i> 4F44.	102
Figure 27. Organisation génétique de la région du gène <i>prtS</i> de <i>Streptococcus thermophilus</i> 4F44.	102
Figure 28. Alignement des séquences partielles des gènes <i>prtS</i> de <i>Streptococcus thermophilus</i> LMD-9 et 4F44 pour mettre en évidence l'absence de la duplication imparfaite de 96 nucléotides retrouvée chez la souche 4F44.	103
Figure 29. Alignement de la séquence protéique déduite du gène <i>prtS</i> de <i>Streptococcus thermophilus</i> 4F44 avec la séquence de protéases PrtS de différentes souches de <i>S. thermophilus</i> et de la protéase de <i>Streptococcus suis</i>	111
Figure 30. Alignement des séquences protéiques d'une portion du domaine A de PrtS (A) et des séquences nucléotidiques codant cette portion (B) chez <i>Streptococcus thermophilus</i> LMD-9 (GI:116100249), 4F44 (GI : 284080586) et CNRZ 385 (GI:9963931).	112
Figure 31. Comparaison du domaine d'ancrage de PrtS des souches de <i>Streptococcus thermophilus</i> 4F44, CNRZ 385, LMD-9 et JIM8232 et de <i>Streptococcus suis</i> 89/1591. Le motif d'ancrage LPNTG reconnu par SrtA est mentionné en gras. Les résidus surlignés sont ceux qui diffèrent de la séquence de 4F44.	112
Figure 32. Gel d'électrophorèse en agarose des produits amplifiés par PCR pour le séquençage du gène <i>srtA</i> chez cinq souches de <i>Streptococcus thermophilus</i> (1 : PB18O, 2 : PB302, 3 : CNRZ307, 4 : 4F44, 5 : LMD-9).	117

Figure 33. Séquence nucléotidique obtenue après séquençage contenant le gène <i>srtA</i> de <i>Streptococcus thermophilus</i> 4F44 (GI:284080588).	118
Figure 34. Alignement de la séquence de la sortase A SrtA de <i>Streptococcus thermophilus</i> 4F44 (gb ADB77873.1), ND03 (gb ABJ66440.1), LMD-9 (gb ADQ63270.1).	120
Figure 35. Alignements de séquences primaires de la sortase A SrtA de <i>Streptococcus thermophilus</i> 4F44 (gb ADB77873.1), <i>S. thermophilus</i> ND03 (gb ABJ66440.1), <i>S. thermophilus</i> LMD-9 (gb ADQ63270.1), <i>S. vestibularis</i> F0396 (gb EFQ59413.1), <i>S. salivarius</i> SK126 (gb EEK09930.1), <i>S. downei</i> (gb EFQ57397.1), <i>S. pyogenes</i> NZ131 (gb ACI61212.1), <i>S. agalactiae</i> NEM316 (gb EAO71811.1), <i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> GGS_124 (YP_002996626.1), <i>S. equi</i> subsp. <i>equi</i> 4047 (YP_002746474.1), <i>S. sobrinus</i> (dbj BAG82878.1), <i>S. mutans</i> NN2025 (YP_003484846.1), <i>S. gallolyticus</i> UCN34 (YP_003429737.1), <i>S. ferus</i> (dbjBAI50581.1), <i>S. suis</i> (dbjBAC56211.1), <i>S. criceti</i> (dbjBAI50579.1) et <i>S. uberis</i> 0140J (YP_002562210.1).	123
Figure 36. Représentation schématique des localisations et séquences C-terminales hypothétiques de la protéase PrtS chez <i>Streptococcus thermophilus</i> 4F44.	125
Figure 37. Recouvrement de la séquence de la protéine PrtS libre de <i>Streptococcus thermophilus</i> 4F44 (GI:284080587, sans le peptide signal) avec les peptides tryptiques identifiés par l'analyse MALDI-TOF MS présentant un mascot score supérieur à 30 (P<0,05) (logiciel MASCOT, Perkins <i>et al.</i> , 1999).	127
Figure 38. Recouvrement de la séquence de la protéine PrtS libre de <i>Streptococcus thermophilus</i> 4F44 (GI:284080587 sans peptide signal) avec les peptides tryptiques identifiés par l'analyse ESI-FT-ICR MS/MS présentant un mascot score supérieur à 30 (P<0,05) (logiciel MASCOT, Perkins <i>et al.</i> , 1999).	128
Figure 39. Mise en évidence par électrophorèse en PAGE-SDS des protéines présentes dans la fraction enrichie obtenue à partir du milieu de culture de <i>Streptococcus thermophilus</i> 4F44 cultivée en milieu M17 pendant 6 h à 42°C.	131
Figure 40. Suivi en PAGE-urée de l'hydrolyse d'un mélange de caséines α_{s1} et β par la fraction enrichie contenant PrtS soluble de <i>Streptococcus thermophilus</i> 4F44.	135
Figure 41. Suivi par RP-HPLC de la cinétique d'hydrolyse (0h, 4h et 24 h) d'un mélange de caséines α_{s1} et β par fraction enrichie de <i>Streptococcus thermophilus</i> 4F44.	136
Figure 42. Localisation sur la séquence primaire de la caséine β variant A2 des peptides résultant de l'action durant 24 h de fraction enrichie contenant la forme soluble de PrtS de <i>Streptococcus thermophilus</i> 4F44.	139
Figure 43. Profils RP-HPLC des hydrolysats obtenus à différents temps d'hydrolyse (1 h, 4 h et 22 h) de la caséine entière bovine (0,1% m/v) par le surnageant de culture (YL, urée et nickel) contenant PrtS après 16 h de croissance de <i>Streptococcus thermophilus</i> 4F44.	141
Figure 44. Profils RP-HPLC des hydrolysats (22h) des protéines lactosériques bovines (0,1% m/v) par le surnageant de culture (YL, urée et nickel) contenant la protéase PrtS après une croissance de <i>Streptococcus thermophilus</i> 4F44 pendant 16 h.	142
Figure 45. Localisation sur la séquence primaire de la caséine β variant A2 des peptides résultant de l'action durant 1, 4 ou 22 h de la protéase PrtS soluble de <i>Streptococcus thermophilus</i> 4F44 contenue dans le surnageant de culture placée dans un tampon Tris 50 mM pH 7 ou MES 50 mM pH 6 en présence de caséine entière à 0,1% ou 0,01% (m/v).	158

- Figure 46. Localisation sur la séquence primaire la caséine α_{s1} variant B des peptides résultant de l'action durant 1, 4 ou 22 h du surnageant de culture, contenant la protéase PrtS soluble de *Streptococcus thermophilus* 4F44, placé dans un tampon Tris 50 mM pH 7 ou MES 50 mM pH 6 en présence de caséine entière à 0,1% ou 0,01% (m/v). 160
- Figure 47. Localisation sur la séquence primaire la caséine α_{s2} variant A des peptides résultant de l'action durant 1, 4 ou 22 h du surnageant de culture, contenant la protéase PrtS soluble de *Streptococcus thermophilus* 4F44, placé dans un tampon Tris 50 mM pH 7 ou MES 50 mM pH 6 en présence de caséine entière à 0,1% ou 0,01% (m/v). 161
- Figure 48. Localisation sur la séquence primaire la caséine κ variant A des peptides résultant de l'action durant 1, 4 ou 22 h du surnageant de culture, contenant la protéase PrtS soluble de *Streptococcus thermophilus* 4F44, placé dans un tampon Tris 50 mM pH 7 ou MES 50 mM pH 6 en présence de caséine entière à 0,1% ou 0,01% (m/v). 162
- Figure 49. Liaison peptidique hydrolysée en position P1-P1' selon la nomenclature de Schechter et Berger (1967). 163
- Figure 50. Spécificité de coupure du fragment (1-23) de la caséine α_{s1} pour différentes bactéries lactiques comparée aux sites de coupure obtenus lors de l'hydrolyse (d'1 h, 4 h ou 22h) de la caséine α_{s1} par le surnageant de culture YL contenant la protéase PrtS soluble après une croissance d'une nuit de *Streptococcus thermophilus* 4F44. 164

Liste des tableaux

Tableau 1. Classements de 34 espèces de streptocoques après analyses phylogénétiques des séquences des ARN 16S (Kawamura <i>et al.</i> , 1995).	24
Tableau 2. Identification des groupes majeurs des espèces du groupe viridans (Facklam, 2002).	26
Tableau 3. Données générales concernant la composition du génome de trois souches de <i>Streptococcus thermophilus</i> (Liu <i>et al.</i> , 2009a).	30
Tableau 4. Séquences codantes tronquées dans les différentes catégories de fonctions chez <i>Streptococcus thermophilus</i> CNRZ1066 et LMG18311 (Bolotin <i>et al.</i> , 2004).	30
Tableau 5. Identification de VRGs (Virulence Related Genes) putatifs dans le génome de <i>Streptococcus thermophilus</i> CNRZ 1066 par comparaison avec ceux des génomes de <i>Streptococcus pyogenes</i> M1 et <i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4 (Bolotin <i>et al.</i> , 2004).	31
Tableau 6. Relevé synthétique des activités peptidasiques intracellulaires ou peptidases caractérisées biochimiquement ou déduites de séquences codantes chez <i>Streptococcus thermophilus</i> (présent travail).	40
Tableau 7. Comparaison du nombre de résidus d'acides aminés composant les différents domaines chez deux souches (CNRZ385 et LMD-9) de <i>Streptococcus thermophilus</i>	49
Tableau 8. Différentes classes de sortases chez les bactéries à Gram positif (Comfort et Clubb, 2004 ; Dramsi <i>et al.</i> , 2005 ; Oxaran <i>et al.</i> , 2010).	55
Tableau 9. Différents inhibiteurs de sortases de <i>Staphylococcus aureus</i>	62
Tableau 10. Souches de <i>Streptococcus thermophilus</i> utilisées dans ce travail.	68
Tableau 11. Compositions des milieux de culture utilisés pour la croissance bactérienne.	69
Tableau 12. Séquences des amorces utilisées pour l'amplification par PCR.	82
Tableau 13. Programmes appliqués pour l'amplification du gène <i>prtS</i>	83
Tableau 14. Programmes appliqués pour l'amplification du gène <i>srtA</i>	83
Tableau 15. Pourcentages d'identité entre la séquence protéique PrtS de <i>Streptococcus thermophilus</i> 4F44 et celle d'autres souches de <i>S. thermophilus</i> ou d'autres espèces de streptocoques.	104
Tableau 16. Recherche de protéines potentiellement ancrées à la paroi car contenant le motif LPXTG chez <i>Streptococcus thermophilus</i> , à l'aide du logiciel « NCBI blast ».	130
Tableau 17. Peptides issus de l'hydrolyse de la caséine β , résultant de l'action pendant 24 h à 37°C de la protéase PrtS soluble présente dans la fraction enrichie du surnageant de culture de <i>Streptococcus thermophilus</i> 4F44 (après 6 h de culture à 42°C en milieu M17).	137
Tableau 18. Peptides issus de l'hydrolyse de la caséine β contenue dans 0,1 ou 0,01% de caséine entière, résultant de l'action pendant 1, 4 ou 22 h à pH 7 ou 6 à 37°C de la protéase PrtS soluble présente dans le surnageant de culture de <i>Streptococcus thermophilus</i> 4F44 (après 16 h de culture à 42°C dans le milieu YL + nickel + urée).	144

Tableau 19. Peptides issus de l'hydrolyse de la caséine α_{s1} contenue dans 0,1 ou 0,01% de caséine entière, résultant de l'action pendant 1, 4 ou 22 h à pH 7 ou 6 à 37°C de la protéase PrtS soluble présente dans le surnageant de culture de *Streptococcus thermophilus* 4F44 (après 16 h de culture à 42°C dans le milieu YL + nickel + urée). 148

Tableau 20. Peptides issus de l'hydrolyse de la caséine α_{s2} contenue dans 0,1 ou 0,01% de caséine entière, résultant de l'action pendant 1, 4 ou 22 h à pH 7 ou 6 à 37°C de la protéase PrtS soluble présente dans le surnageant de culture de *Streptococcus thermophilus* 4F44 (après 16 h de culture à 42°C dans le milieu YL + nickel + urée). 150

Tableau 21. Peptides issus de l'hydrolyse de la caséine κ contenue dans 0,1 ou 0,01% de caséine entière, résultant de l'action pendant 1, 4 ou 22 h à pH 7 ou 6 à 37°C de la protéase PrtS soluble présente dans le surnageant de culture de *Streptococcus thermophilus* 4F44 (après 16 h de culture à 42°C dans le milieu YL + nickel + urée). 152

Tableau 22. Nombre de fragments peptidiques issus de l'hydrolyse des caséines α_{s1} , α_{s2} , β et κ de la caséine entière bovine par la protéase PrtS soluble présente dans le surnageant de culture de *Streptococcus thermophilus* 4F44 cultivée 16 h à 42°C dans un milieu YL + nickel + urée. 153

Tableau 23. Tailles moyennes de fragments peptidiques issus de l'hydrolyse des caséines α_{s1} , α_{s2} , β et κ obtenus après hydrolyse de la caséine entière bovine par le surnageant de culture de *Streptococcus thermophilus* 4F44 contenant la protéase PrtS soluble cultivée 16 h à 42°C dans un milieu YL + nickel + urée. 154

Tableau 24. Spécificité de coupure de l'activité protéolytique contenue dans le surnageant de milieu de culture de *Streptococcus thermophilus* 4F44 (milieu YL + nickel + urée, après 16 h à 42°C) vis-à-vis du résidu P1 de la liaison peptidique clivée de la caséine β (0,1%) à pH 7 après 1 h, 4 h et 22 h d'hydrolyse à 37°C. 167

Tableau 25. Spécificité de coupure de l'activité protéolytique contenue dans le surnageant de milieu de culture de *Streptococcus thermophilus* 4F44 (milieu YL + nickel + urée, 16 h à 42°C) vis-à-vis du résidu P1 de la liaison peptidique clivée de la caséine β (0,1%) à pH 6 après 1 h, 4 h et 22 h à 37°C. 168

Tableau 26. Spécificité de coupure de l'activité protéolytique contenue dans le surnageant de milieu de culture de *Streptococcus thermophilus* 4F44 (milieu YL + nickel + urée, 16 h à 42°C) vis-à-vis du résidu P1 de la liaison peptidique clivée de la caséine α_{s1} (0,1%) à pH 7 après 1 h, 4 h et 22 h à 37°C. 169

Tableau 27. Spécificité de coupure de l'activité protéolytique contenue dans le surnageant de milieu de culture de *Streptococcus thermophilus* 4F44 (milieu YL + nickel + urée, 16 h à 42°C) vis-à-vis du résidu P1 de la liaison peptidique clivée de la caséine α_{s1} (0,1%) à pH 6 après 1 h, 4 h et 22 h à 37°C. 170

Tableau 28. Spécificité de coupure de l'activité protéolytique contenue dans le surnageant de milieu de culture de *Streptococcus thermophilus* 4F44 (milieu YL + nickel + urée, 16 h à 42°C) vis-à-vis du résidu P1 de la liaison peptidique clivée de la caséine α_{s2} (0,1%) à pH 7 après 1 h, 4 h et 22 h à 37°C. 171

Tableau 29. Spécificité de coupure de l'activité protéolytique contenue dans le surnageant de milieu de culture de *Streptococcus thermophilus* 4F44 (milieu YL + nickel + urée, 16 h à 42°C) vis-à-vis du résidu P1 de la liaison peptidique clivée de la caséine α_{s2} (0,1%) à pH 6 après 1 h, 4 h et 22 h à 37°C. 172

Tableau 30. Spécificité de coupure de l'activité protéolytique contenue dans le surnageant de milieu de culture de *Streptococcus thermophilus* 4F44 (milieu YL + nickel + urée, 16 h à 42°C) vis-à-vis du résidu P1 de la liaison peptidique clivée de la caséine κ (0,1%) à pH 7 après 1 h, 4 h et 22 h à 37°C. 173

Tableau 31. Spécificité de coupure de l'activité protéolytique contenue dans le surnageant de milieu de culture de *Streptococcus thermophilus* 4F44 (milieu YL + nickel + urée, 16 h à 42°C) vis-à-vis du résidu P1 de la liaison peptidique clivée de la caséine κ (0,1%) à pH 6 après 1 h, 4 h et 22 h à 37°C. 174

Tableau 32. Synthèse de l'étude de la spécificité de l'enzyme PrtS soluble de *Streptococcus thermophilus* 4F44 par le cumul des nombres de liaisons clivées 175

Tableau 33. Peptides à activité biologique, issus de l'hydrolyse de la caséine entière (à 0,1 ou 0,01%), résultant de l'action pendant 1, 4 ou 22 h à pH 7 ou 6 à 37°C de la protéase PrtS soluble présente dans le surnageant de culture de *Streptococcus thermophilus* 4F44 (après 16 h de culture à 42°C dans le milieu YL + nickel + urée)..... 178

Tableau 34. Peptides à activité biologique issus de l'hydrolyse de la caséine β contenus dans 0,1 ou 0,01% de caséine entière, résultant de l'action pendant 1, 4 ou 22 h à pH 7 ou 6 à 37°C de la protéase PrtS soluble présente dans le surnageant de culture de *Streptococcus thermophilus* 4F44 (après 16 h de culture à 42°C dans le milieu YL + nickel + urée)..... 180

Tableau 35. Peptides à activité biologique issus de l'hydrolyse de la caséine α_{s1} contenus dans 0,1 ou 0,01% de caséine entière, résultant de l'action pendant 1, 4 ou 22 h à pH 7 ou 6 à 37°C de la protéase PrtS soluble présente dans le surnageant de culture de *Streptococcus thermophilus* 4F44 (après 16 h de culture à 42°C dans le milieu YL + nickel + urée)..... 181

Tableau 36. Peptides identifiés à activité biologique issus de l'hydrolyse de la caséine α_{s2} contenus dans 0,1 ou 0,01% de caséine entière, résultant de l'action pendant 1, 4 ou 22 h à pH 7 ou 6 à 37°C de la protéase PrtS soluble présente dans le surnageant de culture de *Streptococcus thermophilus* 4F44 (après 16 h de culture dans le milieu YL + nickel + urée à 42°C)..... 181

Tableau 37. Peptides à activité biologique détectés dans l'hydrolysats de la caséine entière (0,1 ou 0,01%), pendant 1, 4 ou 22 h à pH 7 ou 6 à 37°C par la protéase PrtS soluble présente dans le surnageant de culture de *Streptococcus thermophilus* 4F44 (après 16 h de culture à 42°C dans le milieu YL + nickel + urée) et ceux détectés par Miclo *et al.* (accepté) lors de l'hydrolyse (4 h à pH 7,5) de caséines individuelles par les cellules bactériennes de la souche 4F44. 197

Introduction bibliographique

1. Place de *Streptococcus thermophilus* au sein du genre *Streptococcus*

Le genre *Streptococcus* appartient au phylum des *Firmicutes* et regroupe des bactéries à coloration Gram positive, dépourvues d'activité catalase, et à bas pourcentage en bases G+C (Farrow et Collins, 1984). Les streptocoques sont tous immobiles, asporulés, en chaînettes ou en diplocoques, certains présentent une capsule. Il s'agit de bactéries exigeantes ; pour croître elles ont souvent besoin de facteurs de croissance (retrouvés dans le sang par exemple), d'une atmosphère enrichie en dioxyde de carbone et d'être incubées à au moins 37°C.

Au cours de ces trois décennies, la taxonomie et la nomenclature du genre *Streptococcus* ont subi des modifications. Ces modifications ont été proposées au début des années 1990 sur la base d'études menées à l'échelle moléculaire telles que des techniques d'hybridation ADN/ADN, et des analyses comparatives de séquences correspondant aux ARNr 16S (Bentley *et al.*, 1991 ; Schleifer *et al.*, 1991). Après analyses des séquences codant les ARNr 16S de 34 espèces de streptocoques, Kawamura et ses collaborateurs (1995), les ont classées dans 6 groupes. Cinq groupes phylogénétiques (*mitis*, *anginosus*, *salivarius*, *bovis*, et *mutans*) forment le groupe des streptocoques viridans. Le sixième groupe est le groupe des streptocoques pyogènes. Trois espèces ne sont affiliées à aucun de ces groupes : il s'agit de *Streptococcus suis*, *Streptococcus acidominimus* et *Streptococcus pleomorphus* (Tableau 1). Le dendrogramme proposé en figure 1 illustre les relations phylogénétiques de 55 espèces de *Streptococcus* basées sur les séquences de gène d'ARN 16S (Facklam, 2002). En microbiologie clinique cette classification n'est pas optimale pour l'auteur qui préfère proposer une classification basée sur des critères phénotypiques. Ainsi, Facklam (2002) sépare :

- les streptocoques bêta-hémolytiques qui renferment les espèces suivantes : *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. equi*, *S. canis*, le groupe de *S. anginosus*, *S. constellatus*, *S. porcinus*, *S. iniae*, *S. phocae* et *S. didelphis* ;

- des streptocoques non-bêta-hémolytiques qui comportent *S. pneumoniae*, les espèces du groupe de *S. bovis*, *S. suis* et des espèces du groupe viridans. Cette classification répartit les 26 espèces des streptocoques du groupe *viridans* (appelés également par d'autres auteurs, streptocoques oraux) en 5 sous-groupes : *mutans*, *salivarius*, *anginosus*, *sanguinis*, *mitis* (Tableau 2). Parmi tous ces streptocoques, il existe différentes espèces commensales opportunistes ou pathogènes.

Tableau 1. Classements de 34 espèces de streptocoques après analyses phylogénétiques des séquences des ARN 16S (Kawamura *et al.*, 1995).

	Mitis
	<i>S. mitis</i>
	<i>S. gordonii</i>
	<i>S. pneumoniae</i>
	<i>S. oralis</i>
	<i>S. sanguis</i>
	<i>S. parasanguis</i>
	Anginosus
	<i>S. anginosus</i>
	<i>S. constellatus</i>
	<i>S. intemedius</i>
	Salivarius
Groupe des streptocoques viridans	<i>S. salivarius</i>
	<i>S. thermophilus</i>
	<i>S. vestibularis</i>
	Bovis
	<i>S. bovis</i>
	<i>S. equinus</i>
	<i>S. alactolyticus</i>
	Mutans
	<i>S. rnutans</i>
	<i>S. rattus</i>
	<i>S. cricetus</i>
	<i>S. downei</i>
	<i>S. sobrinus</i>
	<i>S. acacae</i>
	Pyogène
Groupe des streptocoques pyogènes	<i>S. pyogenes</i>
	<i>S. agalactiae</i>
	<i>S. canis</i>
	<i>S. dysgalactiae</i>
	<i>S. equi</i>
	<i>S. iniae</i>
	<i>S. porcinus</i>
	<i>S. uberis</i>
	<i>S. parauberis</i>
	<i>S. hyointestinalis</i>
	Non classé
	<i>S. acidominimus</i>
	<i>S. suis</i>
	<i>S. pleomorphus</i>

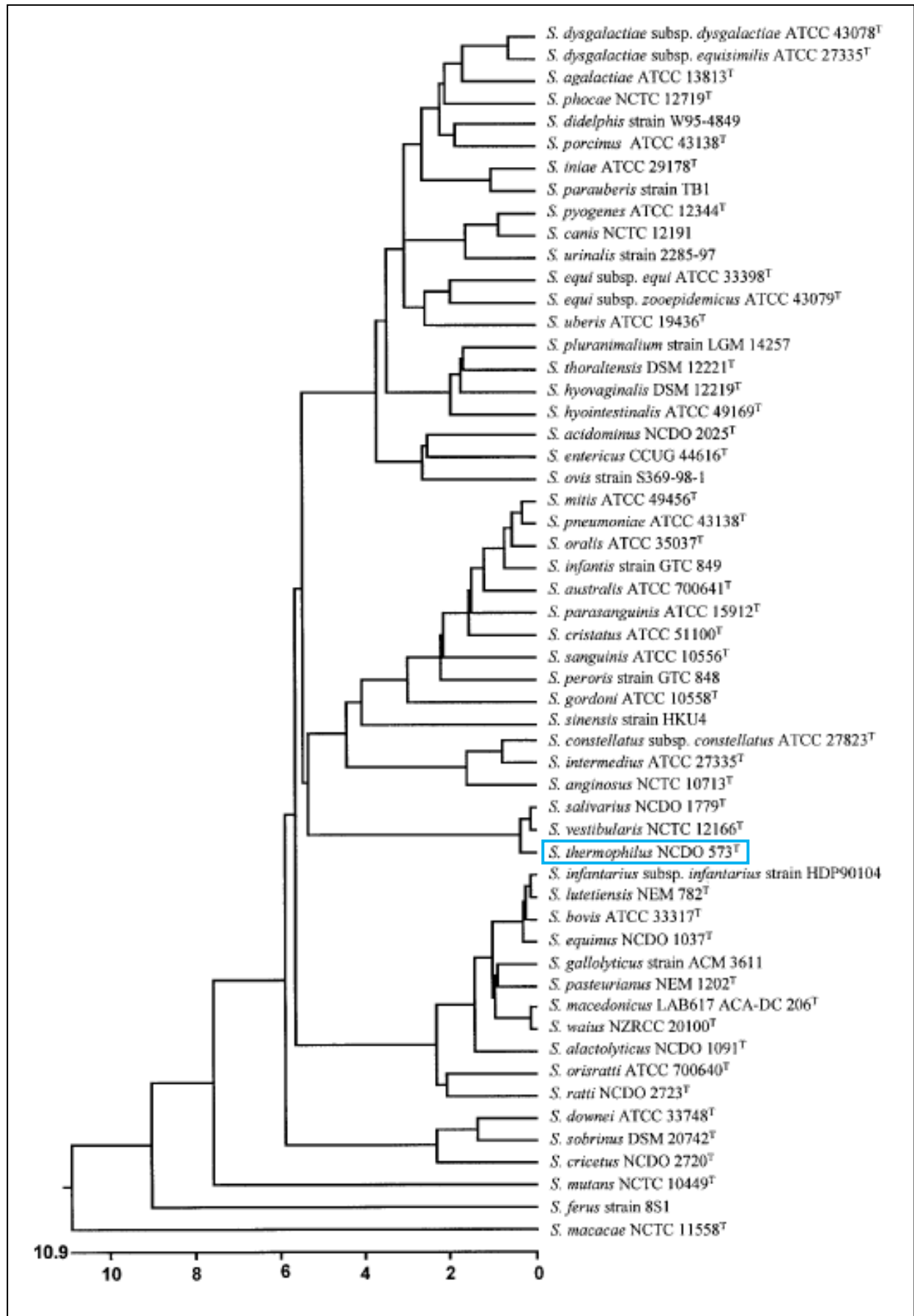


Figure 1. Relations phylogénétiques de 55 espèces de *Streptococcus* basées sur la séquence du gène de 16S ARN (Facklam, 2002).

Tableau 2. Identification des groupes majeurs des espèces du groupe viridans (Facklam, 2002).

Groupes et espèces	Origine
Groupe mutans	
<i>S. mutans</i>	Homme
<i>S. sorbinus</i>	Homme, rat
<i>S. cricetus</i>	Homme, rat
<i>S. downei</i>	Singe
<i>S. ferus</i>	Rat
<i>S. macaccae</i>	Singe
<i>S. ratti</i>	Rat, Homme
<i>S. hyovaginalis</i>	Porc
Groupe salivarius	
<i>S. salivarius</i>	Homme
<i>S. vestibularius</i>	Homme
<i>S. infantarius</i>	Homme
<i>S. alactolyticus</i>	Porc, Oiseau
<i>S. hyointestinalis</i>	Porc
<i>S. thermophilus</i>	Produits laitiers
Groupe anginosus	
<i>S. anginosus</i>	Homme
<i>S. constellatus</i>	Homme
<i>S. intermedius</i>	Homme
Groupe sanguinus	
<i>S. sanguinus</i>	Homme
<i>S. parasanguinus</i>	Homme
<i>S. gordonii</i>	Homme
Groupe mitis	
<i>S. mitis</i>	Homme
<i>S. oralis</i>	Homme
<i>S. cristatus</i>	Homme
<i>S. infantis</i>	Homme
<i>S. perois</i>	Homme
<i>S. orisratti</i>	Homme

Chez les streptocoques bêta-hémolytiques, sont retrouvés notamment *S. pyogenes* et *S. agalactiae*.

S. pyogenes peut provoquer différentes infections de muqueuses, de la peau, de tissus plus profonds causant : pharyngite, impétigo, pyodermie, syndrome streptococcal toxique, septicémie, pneumonie et méningite (Cunningham, 2000 ; Idigoras *et al.*, 2001). Différents facteurs de virulence comme la protéine M, la protéine F, la C5a-peptidase (ScpA), et la protéine "G-related α 2-macroglobulin-binding protein" (GRAB) sont ancrés à la paroi grâce à la sortase A (SrtA) qui a une activité endo-transpeptidasiq (Barnett and Scott, 2002).

S. agalactiae est un constituant normal de la flore digestive humaine. Il est reconnu comme étant la première cause d'infections néonatales sévères (septicémies, méningites et pneumonies) en colonisant les voies respiratoires des jeunes enfants, et est également responsable d'infections chez la femme en colonisant les voies urogénitales. Cette bactérie, également pathogène pour l'animal, est retrouvée dans de nombreux cas de mammites chez la vache (Facklam, 2002 ; Edwards et Baker, 2005 ; Johri *et al.*, 2006 ; Shet et Ferrieri, 2004 ; Cole *et al.*, 2008).

Chez les streptocoques viridans (ou oraux), sont retrouvés par exemple *S. pneumoniae*, *S. mutans*, *S. salivarius* mais aussi *S. thermophilus*.

S. pneumoniae colonise l'homme notamment au niveau du nasopharynx. Ce micro-organisme provoque d'autres types d'infections que la pneumonie ; entre autres : la sinusite aiguë, l'otite moyenne aiguë, la bactériémie, la méningite, l'ostéomyélite, l'arthrite septique, l'endocardite, la péritonite, la péricardite. De nombreux travaux de recherche ont été menés pour identifier les facteurs jouant un rôle dans la colonisation et la pathogénicité, dans le but de proposer de nouveaux agents thérapeutiques ou vaccins (autre que les vaccins "polysaccharidiques"). Ainsi il a été démontré que certains facteurs permettant l'adhésion et la colonisation de la bactérie étaient ancrés à la paroi *via* la sortase SrtA. Cette protéine pourrait être utilisée comme molécule antigénique pour faire un vaccin "protéique" (Paterson et Mitchell, 2006 ; Gianfaldoni *et al.*, 2009).

S. mutans, retrouvé au niveau de la plaque dentaire, est responsable des caries dentaires notamment dues à la transformation de certains glucides en acide lactique qui attaque l'émail dentaire. Cette bactérie peut provoquer également des endocardites. *S. mutans* sécrète diverses protéines extracellulaires (adhésines) ancrées à la paroi. Cet ancrage à la paroi de la bactérie est réalisé par SrtA. Chez *S. mutans*, un mutant *srtA*⁻ colonise moins bien la cavité buccale (Lévesque *et al.*, 2005 ; Lee et Boran, 2003).

S. salivarius est également une bactérie commensale de la cavité buccale ; elle compose en partie la plaque dentaire, elle peut se retrouver dans le sang après brossage des dents ou extraction dentaire et ensuite dans quelques cas engendrer des septicémies chez des patients neuropéniques (Carratalá *et al.*, 1995; Sass *et al.*, 2006).

S. thermophilus se retrouve au sein du groupe "salivarius". Au sein du genre *Streptococcus*, *S. thermophilus* est la seule espèce "alimentaire" parmi des espèces commensales, opportunistes et pathogènes (Delorme, 2008). Elle est ainsi la seule espèce de streptocoque à être GRAS (Generally Recognized As Safe). Les différentes souches de *S. thermophilus* ont été fréquemment isolées d'environnements laitiers, mais certaines souches ont été isolées de végétaux en Bulgarie (Michaylova *et al.*, 2002). *S. thermophilus* appartient au groupe salivarius. Les comparaisons de séquences des gènes ARNr 16S et *sodA* des 3 espèces du groupe salivarius, (*S. salivarius*, *S. thermophilus*, *S. vestibularis*) ont montré que ces espèces étaient étroitement liées génétiquement (Kawamura *et al.*, 1995 ; Poyart *et al.*, 1998). D'ailleurs, pendant plusieurs années, *S. thermophilus* a été classé comme une sous-espèce de *S. salivarius*, et était nommé : *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*. Récemment, la diversité génétique du groupe salivarius a été étudiée en utilisant la technique MLST (Multilocus Sequence Typing). C'est une méthode de typage impliquant l'identification des variations nucléotidiques de différents gènes de ménage (Enright and Spratt, 1999). Huit gènes domestiques (*ilvC*, *pepO*, *pyrE*, *glcK*, *ddlA*, *thrS*, *dnaE* et *tkl*), de 63 souches du groupe "salivarius", ont été amplifiés et séquencés. L'analyse des profils alléliques et des clusters phylogénétiques de chaque locus confirme que *S. thermophilus* est une espèce bien distincte des deux autres espèces (*salivarius* et *vestibularis*) (Hols *et al.*, 2005 ; Delorme, 2008). De plus, les souches de *S. thermophilus* présentaient une faible variabilité allélique, ce qui est le reflet d'une émergence récente.

2. Adaptation de *S. thermophilus* à l'environnement lait

2.1. Caractéristiques de *S. thermophilus*

S. thermophilus est une bactérie lactique thermophile anaérobie et aérotoleante dont la température optimale de croissance se situe entre 37°C et 42°C. En industrie agro-alimentaire, *S. thermophilus* est en deuxième position derrière *L. lactis* dans le classement des bactéries lactiques utilisées. Elle est la seule espèce du genre streptocoque utilisée dans la fabrication des produits laitiers fermentés (de Roissart et Luquet, 1994) grâce à son rôle dans la fermentation du lait qui transforme le lactose en acide lactique (homofermentaire), entraînant la diminution rapide du pH. La conséquence de cette acidification est la précipitation des caséines. Cette bactérie est utilisée dans la fabrication de nombreux fromages, à pâtes pressées cuites (Emmental, Gruyère, Parmesan et Grana-types, ...) mais aussi pour la Mozzarella, le Cheddar, et certains laits fermentés. Dans la fabrication de fromages, *S. thermophilus* est utilisé seul ou en combinaison avec d'autres ferments. Pour la fabrication de yaourts, *S. thermophilus* est toujours employé en co-culture avec

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* (*Lb. bulgaricus*) (Rasic et Kurmann, 1978 ; Tamime et Deeth, 1980) d'après le décret n°88-1203, 30 décembre 1988 art. 2, al. 1^{er} en France.

En plus de la baisse rapide du pH, *S. thermophilus* produit des métabolites importants pour des propriétés technologiques spécifiques des produits laitiers. Ainsi, de nombreuses souches de *S. thermophilus* synthétisent des exopolysaccharides (EPS) qui contribuent à obtenir une texture et des propriétés rhéologiques recherchées pour les produits laitiers fermentés.

2.2. Evolution génomique de *Streptococcus thermophilus*

Les analyses génomiques comparatives entre les deux souches CNRZ1066 et LMG18311, ou entre les trois souches CNRZ1066, LMG18311 et LMD-9 suggèrent que *S. thermophilus* a émergé récemment (Tableau 3), et évolué principalement par perte de fonctions de virulence et/ou acquisition de nouvelles fonctions par transfert horizontal (Bolotin *et al.*, 2004 ; Hols *et al.*, 2005).

2.2.1. Gènes inactivés chez *S. thermophilus* : pseudogènes

Au cours de l'évolution, la plupart des fonctions perdues chez *S. thermophilus* l'ont été par des mutations localisées soit dans la séquence codante ou dans les signaux de régulation et d'expression tels que les promoteurs, les RBS ("ribosome binding site") et les sites de fixation des régulateurs. Tous ces gènes inactivés sont appelés globalement des pseudogènes. Leur proportion est relativement élevée chez *S. thermophilus* (10-11%, par rapport à celle des streptocoques pathogènes qui a été estimée à seulement 4,2%, 0,7% et 1,6% respectivement, dans les génomes de *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* et *S. agalactiae*) et suggère que cette espèce a évolué principalement par la perte de fonctions. (Hols *et al.*, 2005 ; Bolotin *et al.*, 2004). Les deux souches LMG18311 et CNRZ1066, présentent globalement les mêmes pseudogènes, 60% des gènes affectés sont des gènes appartenant à la catégorie nommée "autres fonctions" (conditions atypiques, phages, transposons). Toutes les fonctions ne sont pas affectées de la même façon. Ainsi les fonctions liées au métabolisme énergétique présentent près de 30% des gènes tronqués alors que celles liées au métabolisme des ARN n'en présentent aucun (Tableau 4). Plus de la moitié (4/9) des gènes dédiés au transport des glucides sont des pseudogènes. Ces 4 pseudogènes *ptsG*, *fruA*, *bglP*, et *treP*, qui devraient respectivement coder des transporteurs de glucose, fructose, β -glucoside et de tréhalose, ont été séquencés chez 8 souches différentes de *S. thermophilus* et chez 4 souches de *S. salivarius* (pour cette espèce, le gène *treP* n'a pas été recherché). Seule une souche de *S. thermophilus* présentait un gène *fruA* apparemment fonctionnel, alors que les gènes *ptsG*, *fruA* et *bglP* des 4 souches de *S. salivarius* semblaient intacts. Deux autres gènes *butA* et *adhE* impliqués dans le métabolisme carboné codant l'acétoïne réductase et l'alcool acétaldéhyde deshydrogénase sont inactivés chez

Tableau 3. Données générales concernant la composition du génome de trois souches de *Streptococcus thermophilus* (Liu *et al.*, 2009a).

Souches	Taille (paires de base)	Composition en GC (%)	Nombre d'ORF potentielles	Densité codante (%)	Nombre de gènes associés à des voies métaboliques
CNRZ1066	1 796 226	39,08	1915	85	864
LMG 18311	1 796 846	39,09	1892	85	820
LMD-9	1 856 368	39,07	1716	78	788

Tableau 4. Séquences codantes tronquées dans les différentes catégories de fonctions chez *Streptococcus thermophilus* CNRZ1066 et LMG18311 (Bolotin *et al.*, 2004).

Catégories fonctionnelles	CNRZ1066			LMG18311		
	CDS ¹			CDS ¹		
	Total ²	Tronquées ³	%	Total ²	tronquées ³	%
Biosynthèse des acides aminés	75	4	5,3	74	4	5,4
Biosynthèse des cofacteurs, groupes prosthétiques et transporteurs	45	8	17,8	45	6	13,3
Enveloppe cellulaire	93	18	19,4	93	16	17,2
Processus cellulaires	82	7	8,5	86	7	8,1
Métabolisme central intermédiaire	25	3	12	20	1	5
Métabolisme énergétique	115	34	29,6	119	39	32,8
Métabolisme des acides gras et phospholipides	33	2	6,1	34	2	5,9
Purines, pyrimidines, nucléosides et nucléotides	72	12	16,7	70	12	17,1
Fonctions de régulations	101	23	22,8	100	23	23
Réplication, métabolisme de l'ADN	93	15	16,1	93	13	14
Transcription, métabolisme de l'ARN	37	0	0	37	0	0
Traduction, métabolisme des protéines	146	5	3,4	144	5	3,5
Protéines de liaisons et de transport	253	76	30	246	77	31,3
Autres fonctions	147	90	61,2	82	82	59,4
Protéines hypothétiques	413	55	13,3	425	71	16,7
Inconnues	185			166		
Totales	1915	352	1,4	1890	358	18,9

¹ CDS : séquences codantes.

² indique le nombre total de CDSs

³ correspond au nombre de CDSs tronquées et retrouvées dans les génomes de *S. thermophilus*

S. thermophilus, et ne semblent pas l'être chez *S. salivarius*. Inversement, un transporteur spécifique du lactose (le principale glucide du lait) est présent dans le génome de *S. thermophilus* mais absent chez les autres streptocoques (Bolotin *et al.*, 2004).

2.2.2. Absence de gènes liés à la virulence

De nombreux gènes de virulence VRGs (Virulence Related Genes) retrouvés chez différents streptocoques sont absents du génome de *S. thermophilus* ou ne sont présents que sous forme de pseudogènes (Tableau 5) (Bolotin *et al.*, 2004). Plus de 25% des VRGs absents chez *S. thermophilus* sont présents dans les génomes de *S. pyogenes* et *S. pneumoniae* et 40% d'entre eux sont retrouvés dans des régions qui possèdent la même synténie chez les 2 espèces (Bolotin *et al.*, 2004).

Tableau 5. Identification de VRGs (Virulence Related Genes) putatifs dans le génome de *Streptococcus thermophilus* CNRZ 1066 par comparaison avec ceux des génomes de *Streptococcus pyogenes* M1 et *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 (Bolotin *et al.*, 2004).

	VRGs	VRGs chez <i>S. thermophilus</i>	VRGs inactivés ¹ chez <i>S. thermophilus</i>	% de perte des VRGs chez <i>S. thermophilus</i>
<i>S. pyogenes</i>				
VRGs démontrés ²	21	1	0	95,2
VRGs putatifs ³	29	7	1	75,9
Total	50	8	1	84,0
<i>S. pneumoniae</i>				
VRGs démontrés ²				
- Adhérence	9	4	0	55,6
- Défense de l'hôte	23	5	1	78,3
- Métabolisme	35	20	2	42,9
- Transport/protéase	29	19	3	34,5
- Autres	22	10	1	45,5
Total	118	58	7	50,8

1. Inactivation des gènes par une ou plusieurs mutation(s) frameshift et/ou non-sens ou délétion de l'extrémité 3'

2. Démonstration expérimentale

3. Gènes identifiés lors de l'analyse génomique

Une recherche systématique de VRGs (gènes codant des toxines, des protéines d'adhésion, facteurs permettant la dissémination et la colonisation des bactéries pathogènes) a été réalisée à partir de génomes séquencés de *S. thermophilus*. Ainsi, il est rapporté que les streptocoques pathogènes ont une certaine capacité à dégrader différentes substances carbonées, des polymères complexes glucidiques comme l'amidon ou les dextrans. Cette large capacité à utiliser ces différentes sources carbonées est corrélée au pouvoir pathogène et permet aux bactéries de s'adapter à leur niche écologique (Tettelin *et al.*, 2001).

Globalement, les déterminants principaux qui provoquent la virulence (adhésine, protéines pneumococcales A et C de surface), et qui se trouvent à la surface des cellules bactériennes de streptocoques pathogènes sont soit absents, soit inactivés, chez *S. thermophilus*. D'ailleurs, chez les souches CNRZ1066 et LMG18311, le gène *srtA* codant la sortase A (transpeptidase importante chez les streptocoques pathogènes qui permet la liaison au peptidoglycane de certains facteurs de virulence comme des adhésines), est un pseudogène. (Bolotin *et al.*, 2004). En outre, la résistance aux antibiotiques retrouvée chez les streptocoques pathogènes, est absente chez *S. thermophilus* qui est sensible à de nombreux composés anti-bactériens.

Néanmoins, certains gènes impliqués dans la virulence d'autres streptocoques ont été conservés par *S. thermophilus*. Ils ne lui confèrent pas de propriétés de virulence mais contribuent à d'autres fonctions nécessaires, notamment, à son adaptation dans le lait. Ainsi, *S. thermophilus* est la seule bactérie lactique à présenter une activité uréasique. L'urée présente dans le milieu de culture est dégradée en ammoniacque et dioxyde de carbone, entraînant une hausse transitoire de pH. L'activité uréasique se retrouve fréquemment liée à la pathogénicité des bactéries (*Clostridium perfringens*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus saprophyticus*, *Ureoplasma urealyticum* and *Yersinia enterocolitica*). L'opéron codant pour une activité uréasique fonctionnelle est retrouvé chez 5 espèces *S. alactolyticus*, *S. hyontestinalis*, *S. salivarius*, *S. thermophilus* et *S. vestibularis* parmi 59 espèces du genre *Streptococcus*. Cet opéron chez *S. thermophilus* est 96% identique à celui de la bactérie orale *S. salivarius* (Mora *et al.*, 2004 ; Mora *et al.* 2005a). Les gènes impliqués dans la synthèse des capsules polysaccharidiques entourant les streptocoques pathogènes sont maintenus dans le génome de *S. thermophilus*. Ils contribuent à la production de polysaccharides externes qui confèrent une texture recherchée au yaourt (Tettelin, 2004). Des gènes codant pour un système de transport d'oligopeptides (Ami) indispensables pour la croissance de *S. thermophilus* ont été décrits chez *S. pneumoniae* comme étant impliqués dans la colonisation nasopharyngale (Kerr *et al.*, 2004). Enfin, la protéase PrtS, qui présente 95,9% d'identité avec la protéase de paroi de *S. suis* et qui est impliquée dans sa virulence (Bonifait *et al.*, 2010a), est impliquée dans la genèse de peptides à partir des protéines présentes dans le milieu extracellulaire, donc dans la nutrition azotée de *S. thermophilus*.

2.2.3. Transferts horizontaux de gènes

Le transfert horizontal de gènes (HGT) joue un rôle majeur dans l'évolution des génomes bactériens. Il conduit notamment à un polymorphisme intraspécifique extrêmement important chez les bactéries (Lawrence et Roth, 1999 ; Welch *et al.*, 2002). Ce transfert horizontal constitue le principal mécanisme d'acquisition de nouveaux gènes, impliquant l'acquisition d'un grand nombre de nouvelles fonctions. La recombinaison et le transfert horizontal de gènes contribuent à la plasticité du génome de *S. thermophilus* (Bolotin *et al.*, 2004 ; Lefébure et Stanhope, 2007 ; Marri *et al.*, 2006).

Plus de 50 insertions de séquences ont été dénombrées dans les génomes des souches CNRZ1066 et LMG18311. Certaines séquences présentent un contenu G+C supérieur à 39%, et sont associées à des gènes codant des fonctions utiles à l'adaptation au milieu laitier. Par exemple, un morceau (de 3,6 kb) du chromosome de *Lb. bulgaricus* portant le gène *metC* impliqué dans la synthèse de la méthionine a été retrouvé sur le génome de *S. thermophilus*. Ce gène est utile pour l'adaptation en milieu lait, puisque cet acide aminé y est rare. Ce transfert de gènes a dû avoir lieu au cours de cocultures de *S. thermophilus* avec *Lb. bulgaricus* lors de la fabrication de yaourt (Bolotin *et al.*, 2004). Le gène *prtS* codant la protéase PrtS a été acquis par HGT. L'analyse génomique montre que le gène *prtS* fait partie d'un îlot flanqué de deux éléments de séquence d'insertion (IS), qui contient également trois autres gènes présentant une forte identité (au moins 91%) et une synténie avec le génome de *S. suis* (Figure 2).

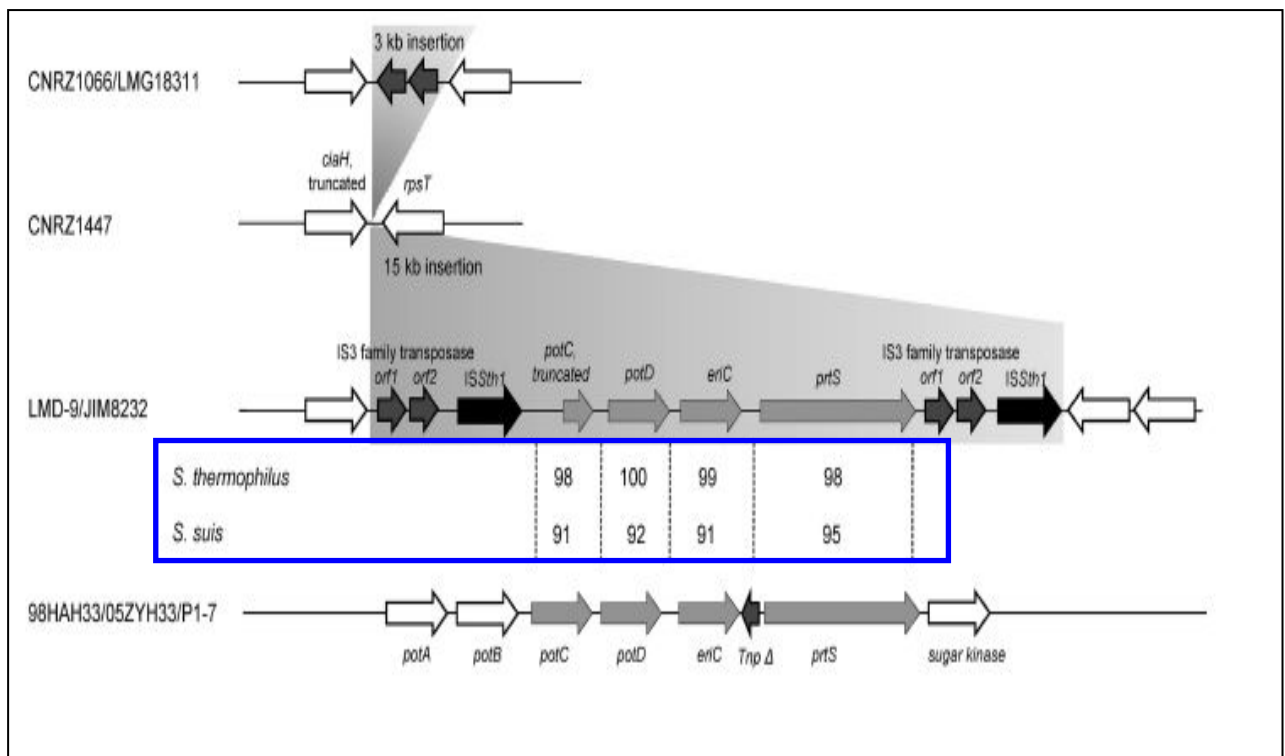


Figure 2. Organisation génétique de la région chromosomique entourant l'îlot *prtS* chez *Streptococcus thermophilus* (LMD-9, JIM8232, CNRZ1447, CNRZ1066, et LMG18311) et *Streptococcus suis* (Delorme *et al.*, 2010).

Les régions synténiques présentes chez les génomes de *S. thermophilus* et *S. suis* sont surlignées en gris, les régions représentées en noir et en blanc correspondent respectivement à la famille de la transposase IS3 et à IS Sth1. Chez *S. suis*, la région intergénique entre *eriC* et *prtS* contient un vestige d'un gène codant pour une transposase. Les pourcentages d'identité des séquences codantes de l'îlot de *prtS* entre deux souches de *S. thermophilus* (LMD-9 et JIM8232) et entre différentes souches de *S. suis* (98 HAH33, 05ZYH33 et P1-7) sont indiqués dans le rectangle bleu.

Ces données indiquent que cet îlot génomique a comme origine putative des espèces très proches de *S. suis*. L'analyse de la distribution du gène de *prtS*, au sein de l'espèce *S. thermophilus*, montre que le gène est peu fréquent dans les collections historiques, contrairement aux collections industrielles récentes. De plus, cet îlot génomique a été disséminé par transfert horizontal dans la population de *S. thermophilus*. Les industriels ont joué un rôle primordial pour faire émerger ces souches protéolytiques (Delorme *et al.*, 2010). En effet, jusque récemment, l'espèce était décrite comme étant peu protéolytique. L'émergence de la protéase PrtS permet d'obtenir des souches ayant un intérêt technologique. En effet, les capacités acidifiantes (propriétés recherchées en industrie) sont liées aux propriétés protéolytiques (Shahbal *et al.*, 1991 ; Galia *et al.*, 2009).

3. Système protéolytique chez *S. thermophilus*

Le lait est un milieu riche en glucides fermentescibles (lactose 50 g/L), en matières azotées (30 à 34 g/L) composées principalement de protéines, mais aussi d'acides aminés et de peptides, d'urée, de bases azotées et de vitamines.

Les concentrations en acides aminés et peptides du lait sont inférieures aux concentrations requises pour une bonne croissance de *S. thermophilus*. Par exemple pour les deux acides aminés essentiels que sont l'acide glutamique et la méthionine, leur concentration est respectivement de 45 et <1 mg/L, dans le lait, alors que *S. thermophilus* a besoin pour croître d'une concentration de 200 mg/L et 60 mg/L respectivement (Letort et Juillard, 2001). La croissance de *S. thermophilus* dans le lait, est donc liée à sa capacité à utiliser les lactoprotéines comme source des acides aminés que la bactérie n'est pas capable de synthétiser et qui ne sont pas en quantité suffisante sous forme libre (Garault *et al.*, 2000 ; Fernandez-Espla, 2000 ; Savijoki *et al.*, 2006).

Ce système protéolytique est composé de différents acteurs (Figure 3) :

- d'une protéase de paroi, appelée PrtS (présentes chez certaines souches) ;
- de systèmes de transport d'oligo et de di-tri peptides ;
- de peptidases intracellulaires qui hydrolysent les peptides internalisés.

Les systèmes de transport et les peptidases intracellulaires vont être présentés avant de détailler la protéase de paroi PrtS et son ancrage au peptidoglycane.

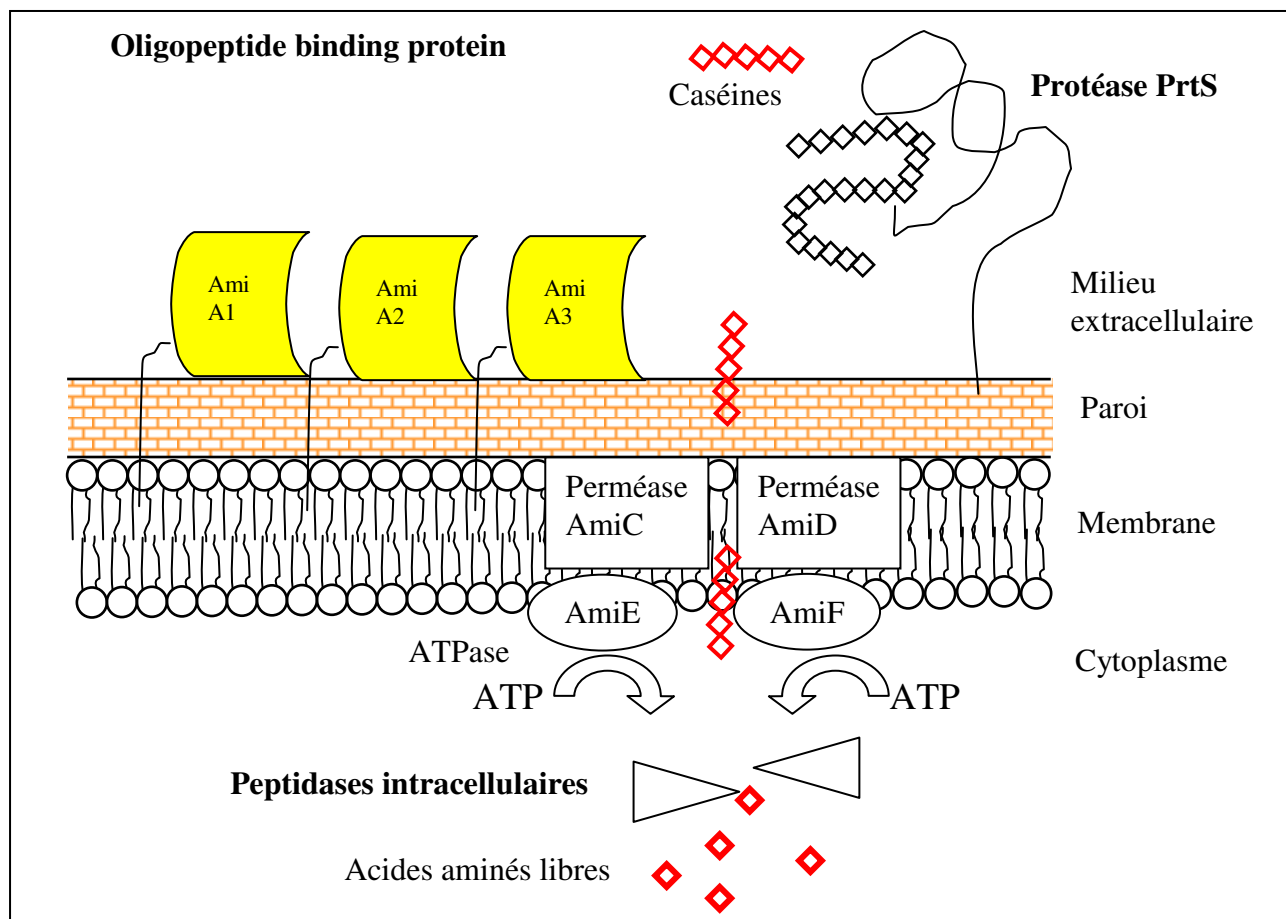


Figure 3. Représentation schématique du système protéolytique chez *Streptococcus thermophilus* d'après Garault *et al.* (2002) et Monnet (2006).

3.1. Système de transport

3.1.1. Système de transport modèle Opp

L'enveloppe des bactéries représente une barrière physique que les nutriments doivent traverser pour permettre la croissance cellulaire. En fonction des caractéristiques de la molécule à internaliser, le transport peut se faire sans apport d'énergie (diffusion simple ou facilitée) ou avec couplage d'une source d'énergie métabolique (transport actif). Si cette source d'énergie est une réaction chimique exergonique, typiquement l'hydrolyse de l'ATP, nous parlons alors de transport actif primaire. Il est dit secondaire, si le composé est transporté en utilisant un gradient de concentration ionique mis en place par un transporteur primaire (Hiron, 2007).

L'utilisation d'oligopeptides (initialement présents dans le lait ou dérivés de l'hydrolyse des caséines par l'enzyme à la paroi) est indispensable à une croissance optimale des bactéries lactiques (BL) dans le lait. Leur utilisation est conditionnée par leur transport à travers la paroi et la membrane *via* un système de transport des oligopeptides (Savijoki *et al.*, 2006 ; Charbonnel *et al.*, 2004).

Le transport des oligopeptides vers le milieu est actif. Il s'agit d'un système de transport primaire de type ABC transporteur appelé système Opp chez *L. lactis* qui se compose de :

- une protéine affine pour les oligopeptides : OppA ;
- deux protéines membranaires formant un canal : OppB et OppC ;
- deux protéines enzymatiques de type ATPases : OppD et OppF.

Le peptide se fixe à OppA qui elle-même se lie au complexe OppBCDF (Figure 4). Lorsque l'ATP se lie aux ATPases il y a un changement de conformation du transporteur ; celui-ci s'ouvre vers le milieu extérieur et il y a séparation du peptide d'OppA. Le peptide se retrouve dans le canal formé par OppB et OppC tandis qu'OppA est relâchée. L'hydrolyse de l'ATP permet le passage du peptide dans le milieu intracellulaire (Doeven *et al.*, 2008).

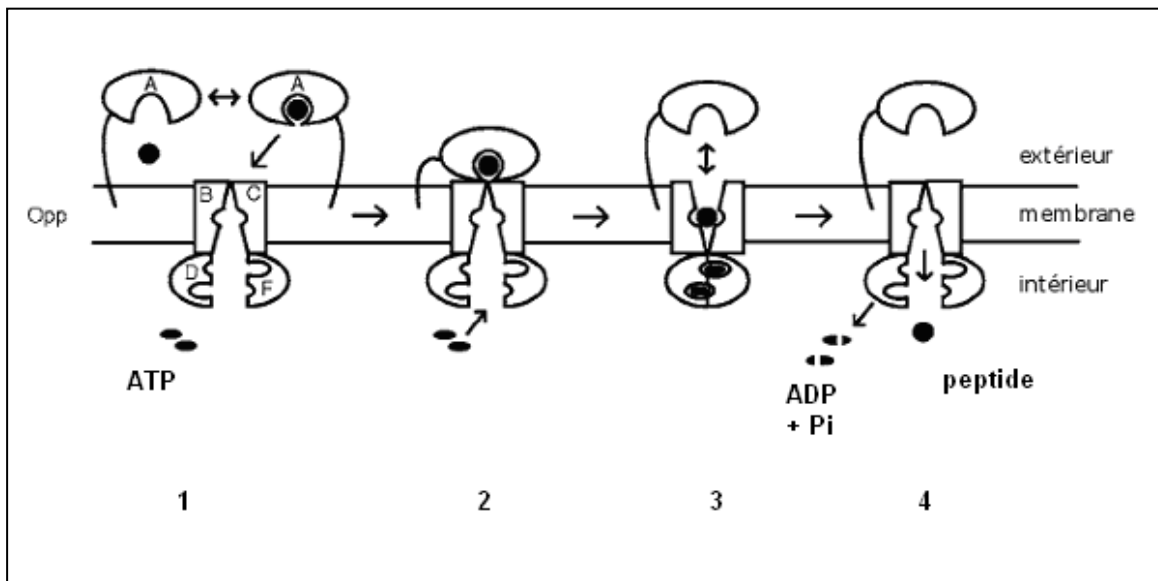


Figure 4. Modèle de transport d'oligopeptides (Opp) chez les bactéries Gram⁺ (Doeven *et al.*, 2008).

1. Le substrat se lie à la protéine affine aux oligopeptides (OppA)
2. OppA change de conformation, l'ATP vient se fixer au niveau des ATPase (OppD et F)
3. Sous l'effet de la fixation de l'ATP, les deux perméases changent de conformation, l'oligopeptide est fixé à OppB et C.
4. L'hydrolyse de l'ATP permet l'internalisation de l'oligopeptide. Tout le système retrouve sa conformation de départ.

3.1.2. Système de transport chez *Streptococcus thermophilus*

Le seul système de transport d'oligopeptides connu chez *S. thermophilus* est le système Ami (Garault *et al.*, 2002). Il s'agit d'un ABC transporteur (ou transporteur à "ATP Binding Cassette") composé de deux protéines transmembranaires (AmiC et AmiD) qui forment un canal pour l'entrée des oligopeptides. Ce transport est actif, les protéines transmembranaires sont associées à deux ATPase (AmiE et AmiF) qui fournissent l'énergie pour le transport en hydrolysant l'ATP.

De plus, à l'extérieur de la cellule, proche des deux protéines transmembranaires, sont situées des protéines affines aux oligopeptides (appelées OBP pour Oligopeptide Binding Proteins). Il existe trois types d'OBP Ami A1, Ami A2 et Ami A3 au sein des différentes souches de *S. thermophilus* (Figure 5). L'ensemble des souches possède le gène *amiA1*, et d'autres souches ont le gène *amiA2* et/ou *amiA3*. Ce système de transport s'appelle le système Ami car ces protéines montrent une forte identité (62 à 86%) avec le système Ami de *Streptococcus pneumoniae* (Alloing *et al.*, 1994).

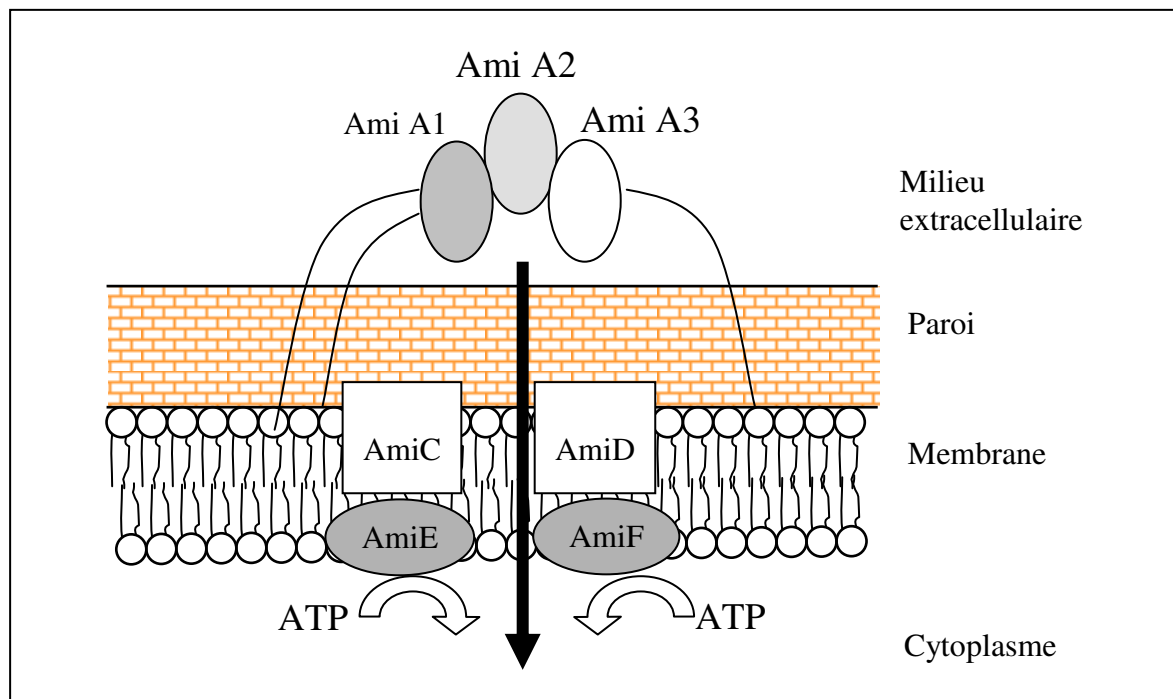


Figure 5. Représentation schématique du système de transport Ami chez *Streptococcus thermophilus*.

Ami A1, A2 et A3 : Protéines affines aux oligopeptides,
 Ami C et D : Perméases,
 Ami E et F : ATPases.

Les gènes *amiA1*, *amiC*, *amiD*, *amiE* et *amiF* sont organisés en opéron (séquence de 7032 pb) alors que les gènes *amiA2* et *amiA3* sont isolés sur le chromosome de *S. thermophilus* (Garault *et al.*, 2002).

Les trois protéines AmiA présentent de fortes homologies entre elles : 97,6% d'identité entre les séquences protéiques AmiA1 et AmiA2 et 87,1% d'identité entre AmiA1 et AmiA3. Les gènes *amiA1* et *amiA2* codent pour des protéines de 655 résidus et *amiA3* pour une protéine de 657 résidus. La forte ressemblance entre les trois protéines AmiA est certainement le résultat de récentes duplications du gène *amiA1*. Ceci expliquerait que les OBP AmiA1, AmiA2 et AmiA3 présentent des spécificités de substrat qui se chevauchent, bien qu'elles soient différentes. AmiA3 a la séquence la plus singulière des trois protéines AmiA, mais également la spécificité la plus distincte.

Par exemple, seule AmiA3 est capable de se lier aux peptides de taille importante (jusqu'à 23 résidus d'acides aminés) (Garault *et al.*, 2002) (Figure 6).

Chez une souche comportant les 3 gènes *amiA*, le système Ami est capable de transporter des peptides de 3 à 23 résidus d'acides aminés ainsi que les aminoptérines, des analogues toxiques de peptides (Garault *et al.*, 2002). La taille n'est pas le seul paramètre à prendre en compte dans le transport des oligopeptides, l'hydrophobie des peptides joue également un rôle non négligeable dans leur internalisation. Un peptide hydrophobe serait plus facilement pris en charge par le système de transport Ami qu'un peptide hydrophile, notamment s'il se fixe à la protéine AmiA3.

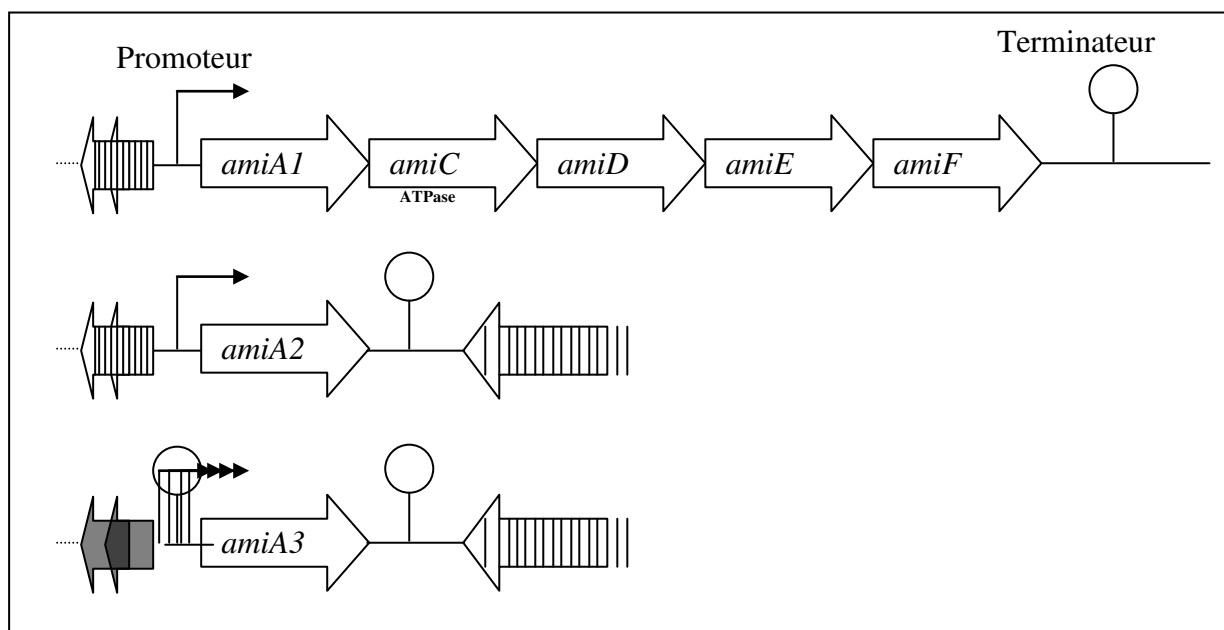


Figure 6. Organisation génétique des gènes *amiA* chez *Streptococcus thermophilus* (Garault *et al.*, 2002).

Chez les bactéries à Gram positif, l'OBP est associée à la membrane. Ainsi chez AmiA1, AmiA2 et AmiA3 le motif "VLAACS" qui permet l'attachement à la membrane a été retrouvé et est reconnu par la voie générale de sécretion Sec. Le peptide signal est alors clivé et la protéine ancrée à la membrane sur la face externe (Garault *et al.*, 2002).

En plus de son rôle dans le métabolisme azoté, le système de transport Ami intervient dans les phénomènes de quorum-sensing. Une molécule signal, sous la forme d'un petit peptide, est relarguée dans le milieu extracellulaire. Elle est ensuite captée puis internalisée par le système de transport Ami avant d'activer un ensemble de gènes. C'est par exemple le cas du phénomène de compétence de *S. thermophilus*. Un peptide est capté par les OBP avec une importance plus marquée pour AmiA3 (perte de réponse en cas de suppression du gène *amiA3*). Une fois dans la cellule, le peptide interagit avec un régulateur transcriptionnel qui agit sur le gène *comX*. L'expression de ce gène activera par la suite les gènes impliqués dans le phénomène de compétence. Ce type de système est fonctionnel à

condition que les cultures soient réalisées dans des milieux pauvres en peptides. Si la concentration en peptides du milieu est trop importante, il y a inhibition par compétition de substrat, par les autres peptides, au niveau de AmiA3 (Gardan *et al.*, 2009).

Selon une étude de Garault et ses collaborateurs (2002), il y aurait un système de transport indépendant pour les dipeptides. En effet, un triple mutant *amiA1/A2/A3⁻* a une croissance semblable à la souche sauvage sur un milieu contenant des dipeptides MH et MK. Ce système n'a, pour l'instant, pas été caractérisé davantage.

3.2. Peptidases intracellulaires

Les peptides internalisés sont alors dégradés par des peptidases cytoplasmiques. L'utilisation des peptides par les bactéries lactiques thermophiles dépend donc de la nature de leurs systèmes de transport de peptides et de leur équipement peptidasique (peptidases intracellulaires).

Les peptidases peuvent être classées en exopeptidases ou endopeptidases. Les exopeptidases hydrolysent les liaisons peptidiques à partir des extrémités amino (aminopeptidases)- ou carboxy (carboxypeptidase) terminales des chaînes polypeptidiques et permettent de libérer des acides aminés. Les endopeptidases hydrolysent les liaisons peptidiques internes à l'oligopeptide. Chez la souche CNRZ302, quinze activités peptidasiques intracellulaires ont été identifiées à l'aide de substrats spécifiques (Rul et Monnet, 1997). Ainsi, cette souche posséderait 3 activités oligoendopeptidasiques (PepO, PepEP et PepF), 4 activités aminopeptidasiques (AP1, PepC, PepN, et PepA), 4 activités peptidasiques spécifiques pour le résidu de proline (PepX, Prd : prolidase, Prn : prolinase, PepP : aminopeptidase P), et enfin 4 activités di-tripeptidasiques (DP1, DP2, TP1 et TP2).

D'après Liu *et al.*, 2009b, la souche de *S. thermophilus* KLDS3.0503 possède 12 gènes fonctionnels codant pour douze peptidases intracellulaires différentes : PepO, PepA, PepN, PepC, PepS, PepB, PepQ, PepV, PepT, PepM, PepXP, PepP. Parmi ces peptidases, 6 d'entre elles ont été préalablement purifiées et caractérisées. Il s'agit de PepO (Chavagnat *et al.*, 2000), PepA (Rul *et al.*, 1995), PepN (Rul *et al.*, 1994), PepC (Chapot-Chartier *et al.*, 1994), PepS (Fernandez-Espla et Rul, 1999), et PepX (Tsakalidou *et al.*, 1998) (Tableau 6).

Jusqu'à présent, aucune enzyme ayant une activité carboxypeptidasique n'a été rapportée pour toutes les bactéries lactiques. Après l'internalisation des peptides issus de l'hydrolyse de la caséine par une protéase, ces peptides sont dégradés par l'action harmonisée de peptidases avec des spécificités différentes, partiellement chevauchantes (Kunji *et al.*, 1996).

Tableau 6. Relevé synthétique des activités peptidasiques intracellulaires ou peptidases caractérisées biochimiquement ou déduites de séquences codantes chez *Streptococcus thermophilus* (présent travail).

Peptidases ou activités peptidasiques Spécificité de coupure chez la (ou les) souche(s) étudiée(s) et caractéristiques biochimiques	Numéro d'accèsion du gène codant pour la peptidase chez les souches dont le génome est entièrement séquencé			
	LMD-9	LMG18311	CNRZ1066	ND03
Endopeptidases				
PepO : Métallopeptidase (endopeptidasique) Souche A : 70 kDa, p _H 6,5, T _o 41 °C (Chavagnat <i>et al.</i> , 2000)	(YP_821179)	(YP_140299)	(YP_142213)	(ADQ63857)
PepF/PepB	(YP_819966)	(YP_140869)	(YP_138979)	(ADQ62516)
Oligoendopeptidase F	(YP_820673)			
Aminopeptidases				
PepA : Métallopeptidase (Glu-X et Asp-X) Souche CNRZ 302 : 45 kDa, p _H 8,5, T _o 62 °C (Rul <i>et al.</i> , 1995)	(YP_821150)	(YP_140265)	(YP_142180)	(ADQ63821)
PepN : Métallopeptidase à spécificité large : résidus ni acides ni Pro en position P2 Souche CNRZ302 : 97 kDa, p _H 7,0, T _o 36°C (Rul <i>et al.</i> , 1994) Souche A : 95 kDa, p _H 7,0, T _o 37°C (Chavagnat <i>et al.</i> , 1999)	(YP_820418)	(YP_139482)	(YP_141400)	(ADQ63016)
PepC : Peptidase à cystéine à spécificité large : résidus basiques, neutres hydrophobes et acides Souche CNRZ 302 : 50,4 kDa, p _H 7,0, T _o 50°C (Chapot-Chartier <i>et al.</i> , 1994)	(YP_819783)	(YP_138769)	(YP_140658)	(ADQ62298)
PepS : Métallopeptidase (Arg-X, Tyr-X, Phe-X et Trp-X). Souche CNRZ 302 45 kDa, p _H 8,0, T _o 55 °C (Fernandez-Espla et Rul, 1999)	(YP_819646)	(YP_138607)	(YP_140495)	(ADQ62144)
PepM (Liu <i>et al.</i> , 2009b)	(YP_820865)	(YP_139975)	(YP_141902)	
Peptidases spécifiques des résidus de proline				
PepX : Peptidase à sérine (Pro-X) Souche ACA-DC4 80 kDa, p _H 7,0, T _o 50 °C (Tsakalidou <i>et al.</i> , 1998 ; Anastasiou <i>et al.</i> , 2002)	(YP_820974)	(YP_140089)	(YP_142016)	(ADQ63642)
PepP : Activité peptidasique (X-Pro) Souche CNRZ302 (Rul et Monnet, 1997)	(YP_821056)	(YP_140156)	(YP_142075)	(ADQ63712)
PepQ : Activité peptidasique (X-Pro) Souche CNRZ302 (Rul et Monnet, 1997)	(YP_820133)	(YP_139159)	(YP_141040)	(ADQ62690)
PepR : Activité peptidasique (Pro-X) Souche CNRZ302 (Rul et Monnet, 1997)				
Di-tri peptidase				
PepV	(YP_820475)	(YP_139581)	(YP_141490)	(ADQ63093)
PepT	(YP_820484)	(YP_139592)	(YP_141502)	(ADQ63103)

3.3. Protéase de paroi

Il a été observé pour *S. thermophilus* que l'aptitude à croître rapidement dans le lait varie fortement d'une souche à l'autre, ce qui implique une variabilité d'au moins une partie du système protéolytique au sein de l'espèce, notamment au niveau de la protéase de paroi (Shahbal *et al.*, 1991). Dans la littérature, il est décrit que de nombreuses souches sont dépourvues de protéase de paroi. (Galia *et al.*, 2009 ; Delorme *et al.*, 2010). C'est notamment le cas des 3 souches LMG18311, CNRZ1066, NDO3 dont le génome a été séquencé (Bolotin *et al.*, 2004, Sun *et al.*, 2011). A l'inverse, la souche LMD-9, quatrième génome séquencé chez *S. thermophilus* (Makarova *et al.*, 2006), possède une protéase ancrée à la paroi (Galia *et al.*, 2009) permettant de libérer des acides aminés et des petits peptides à partir des protéines majeures du lait ; les caséines. Cette protéase a été biochimiquement caractérisée chez *S. thermophilus* CNRZ385 (Fernandez-Espla *et al.*, 2000).

3.3.1. Caractéristiques de la protéase PrtS

3.3.1.1. Caractéristiques biochimiques des protéases de paroi des bactéries lactiques

Cinq différents types de protéase de paroi (Cell Envelope Proteinase) ont été caractérisés chez diverses bactéries lactiques (Kok *et al.*, 1988 ; Holck and Naes, 1992 ; Gilbert *et al.*, 1996 ; Pederson *et al.*, 1999 ; Siezen, 1999 ; Fernandez-Espla *et al.*, 2000 ; Pastar *et al.*, 2003).

- Prt**P** de *Lactococcus lactis* et de *Lactobacillus paracasei*,
- Prt**S** de *Streptococcus thermophilus*,
- Prt**H** de *Lactobacillus helveticus*,
- Prt**B** de *Lactobacillus bulgaricus*,
- Prt**R** de *Lactobacillus rhamnosus*.

Ces CEPs sont synthétisées sous forme de préproprotéine de 1600 à 2000 résidus et sont constituées de 6 à 8 domaines fonctionnels distincts (Fernandez-Espla *et al.*, 2000 ; Siezen, 1999) (Figure 7) :

1. **Le domaine PP** (pré-prodomaine) est la séquence amino-terminale des CEPs. Il comprend le **prédomaine** correspondant à la séquence du peptide signal (~ 40 résidus) et le **prodomaine** (~ 150 résidus). Le peptide signal est éliminé durant l'exportation à travers la membrane cytoplasmique par une "signal peptidase". La maturation de la protéine est obtenue par perte du prodomaine après clivage.

2. **Le domaine PR** (~ 500 résidus d'acides aminés) constitue la partie amino-terminale de la protéine mature et renferme la triade catalytique spécifique à une protéase à sérine impliquant un résidu d'acide aspartique, un résidu de sérine et un résidu d'histidine. Cette protéase est appelée "subtilisin-like" par homologie de son domaine catalytique avec celui de la subtilisine de *Bacillus subtilis*.

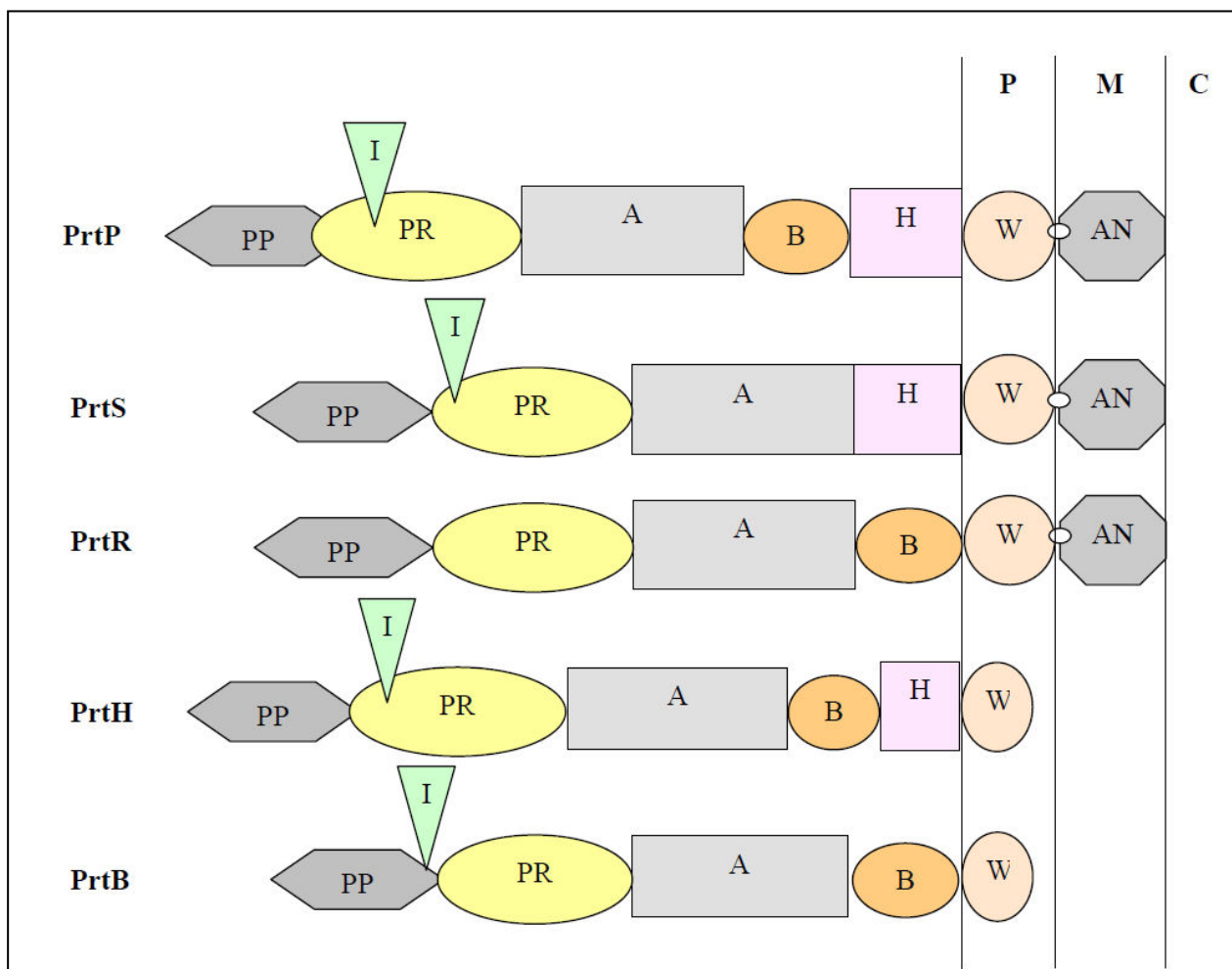


Figure 7. Représentation schématique des CEPs "cell envelope proteases" de différentes bactéries lactiques.

P : paroi ; M : membrane ; C : cytoplasme ; PP : propeptide ; PR : domaine catalytique ; I : domaine d'insertion ; A : domaine globulaire ; B : domaine de la stabilisation de domaine PR ; H : domaine hélicoïdal ; W : "wall domain" ; AN : domaine d'ancrage ; PrtP : *Lactococcus lactis* ; *Lactobacillus paracasei* ; PrtS : *Streptococcus thermophilus* ; PrtR : *Lactobacillus rhamnosus* ; PrtH : *Lactobacillus helveticus*, PrtB : *Lactobacillus bulgaricus* (d'après Siezen, 1999 ; Fernandez-Espla *et al.*, 2000 ; Savijoki *et al.*, 2006).

Les domaines PP et AN sont représentés sur cette figure mais sont respectivement éliminés lors de la maturation et de l'ancrage.

3. **Le domaine insert I** (~ 150 résidus) se situe dans le domaine PR. Pour la protéase PrtR de *Lactobacillus rhamnosus*, ce domaine I est absent (Siezen, 1999). Chez un mutant *prtP* de *Lactococcus lactis* SK11, la séquence codant l'insert a été entièrement supprimée, et seule la spécificité de substrat de la protéase a été modulée par rapport à la souche sauvage (Bruinenberg *et al.*, 1994).

4. **Le domaine A** (~ 400 résidus) est un domaine dont la fonction est inconnue, il est moins conservé que le domaine précédent. Siezen (1999) propose que ce domaine soit impliqué dans la régulation de l'activité protéolytique et/ou agisse sur la spécificité du domaine PR.

5. **Le domaine B** (~ 500 résidus) est retrouvé notamment chez les CEP des lactocoques et lactobacilles (PrtB, PrtH et PrtP), il est encore moins conservé que le domaine A. Ce domaine est impliqué dans la stabilisation de l'activité et la spécificité enzymatique, il est absent chez la protéase PrtS de *S. thermophilus*.

6. **Le domaine H hélicoïdal** (~ 200 résidus) est impliqué dans le bon positionnement des domaines A et B à l'extérieur de la cellule, il est absent des protéases PrtB de *Lactobacillus bulgaricus* et PrtR de *Lactobacillus rhamnosus*.

7. **Le domaine W (wall domain)** est un domaine hydrophile (~ 100 résidus) qui fonctionne comme un espaceur au niveau de la paroi. Il peut servir de domaine de fixation des protéases notamment pour PrtB de *L. bulgaricus*.

8. **Enfin le domaine AN** (~35 résidus) qui est un domaine d'ancrage suit le domaine W, et n'est pas présent pour toutes les protéases de paroi.

Chez les bactéries à Gram positif, trois mécanismes d'attachement de protéases à la surface des cellules bactériennes ont été répertoriés. Le premier, le plus commun, aboutit à la fixation covalente du résidu de thréonine du motif LPXTG du domaine AN au peptidoglycane de la paroi cellulaire. Ce mode d'attachement est trouvé pour PrtP et PrtS. Ce mécanisme sera détaillé ci-après. Par contre, pour la protéase PrtR, le motif d'ancrage est atypique : MPQAG (résidus de Met et d'Ala à la place respectivement des résidus Leu et Thr) (Pastar *et al.*, 2003). Le deuxième mécanisme d'attachement à la paroi cellulaire est dû au domaine W, très hydrophile et chargé positivement, qui permet le lien non-covalent grâce à des interactions électrostatiques et des liaisons hydrogènes (*L. bulgaricus*) (Germond *et al.*, 2003). Enfin, le troisième mécanisme est dû au domaine de type S-layer. Ainsi, la protéase PrtH de *L. helveticus* ne présente pas de motif LPXTG et elle est attachée à la paroi

cellulaire *via* un mécanisme utilisé par les protéines du S-layer (Siezen 1999 ; Pederson *et al.*, 1999 ; Savijoki *et al.*, 2006 ; Navarre et Schneewind, 1994).

3.3.1.2. Relargage de certaines protéases Prt

Chez *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (Laan et Konings, 1989), le gène de la protéase code une protéine de 200 kDa. Après exportation et maturation la protéase atteint 180 kDa, elle est ancrée à la paroi. Après incubation des cellules bactériennes dans un tampon dépourvu de calcium, la protéase est libérée et la masse moléculaire estimée par PAGE-SDS est de 165 kDa. Les auteurs proposent l'hypothèse que la libération se fait par autolyse au niveau de l'extrémité C-terminale. La protéase est liée à la cellule dans une conformation qui est stabilisée par les ions Ca^{2+} . Lorsque les bactéries sont placées dans un tampon dépourvu de calcium, le calcium stabilisant la structure de la protéase, diffuse dans le tampon. Ainsi, la conformation de la protéase change, lui permettant de s'autolyser. Le site de clivage est positionné au niveau du domaine B. Un grand fragment de la protéase est alors libéré dans le milieu (165 kDa) et l'extrémité C-terminale contenant la région d'ancrage reste associée à la paroi cellulaire (Figure 8). Ces résultats ont également été obtenus chez *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ACA-DC 178, *Lc. lactis* Wg2 et *Lc. lactis* SK11 (Tsakalidou *et al.*, 1999 ; Kunji *et al.*, 1996).

La libération de la protéase PrtL de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581, dépend du pH et de la température d'incubation des bactéries et non de la présence ou de l'absence de calcium (Espeche-Turbay *et al.*, 2009).

Chez *L. rhamnosus*, tous les domaines sont présents à l'exception du domaine H et de l'insert I dans le prodomaine. Les auteurs qui ont essayé de libérer la protéase chez cette bactérie en utilisant un tampon dépourvu de calcium, n'ont pas obtenu la protéase libre. Ils ont émis l'hypothèse qu'en l'absence de l'insert, l'activité autoprotéolytique ne pouvait avoir lieu (Pastar *et al.*, 2006).

Chez *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, PrtB ne présente pas le domaine H et ne semble pas être ancrée à la paroi. En effet, PrtB présente une séquence " sorting signal " dégénérée (LPKKT) immédiatement suivie d'une région chargée ; cette séquence dégénérée ne permet pas d'ancrage covalent à la paroi tout comme chez *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NCDO151 (Figure 9) (Gilbert *et al.*, 1996 ; Germond *et al.*, 2003).

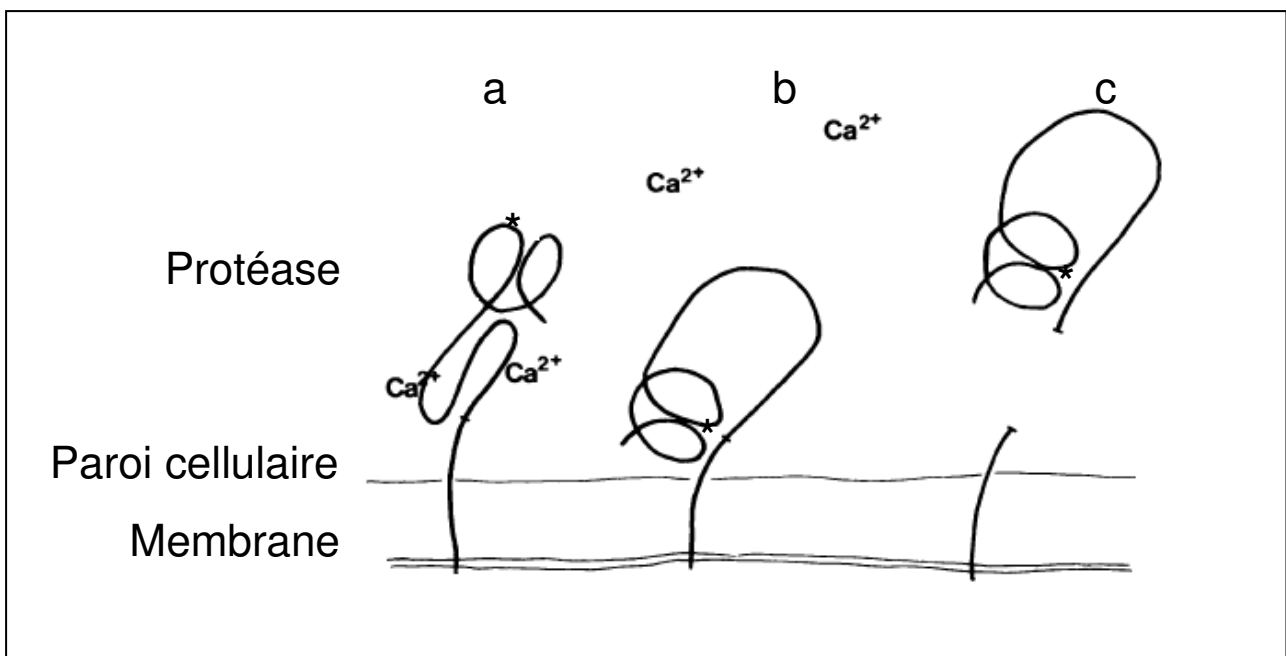


Figure 8. Schéma du mécanisme de libération de la protéase de *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* .

* : site actif de la protéase.

a : la protéase est liée à la cellule dans une conformation qui est stabilisée par les ions Ca^{2+} ,

b : après diffusion des ions Ca^{2+} dans le milieu, la conformation est déstabilisée et un site de clivage sur la protéase est devenu accessible,

c : après le clivage, un grand fragment de la protéase est libéré dans le milieu et l'extrémité C-terminale reste associée à la paroi (D'après Laan et Konings, 1989).

	↓
PrtP ^a	<u>LPKTGETTERPAFGFLGVIVVILMGVLGL</u> --KRKQREE
PrtP ^b	<u>LPKTGETTERPAFGFLGVIVVSLMGVLGL</u> --KRKQREE
PrtP ^c	<u>LPKTGETTERPAFGFLGVIVVSLMGVLGL</u> --KRKQREE
Protéine A	<u>LPETGE</u> --ENPLIGTTVFGGLSLAGAALLAGRRREL
Protéine M6	<u>LPSTGETA</u> -NPFFTAALTMATAGVAAVV-KRKEEN
PrtB	LPKKT KKVKQVRARKSAKVYNKKGKVVGHL-KKKQKVKLLSK
PrtP ^d	LPKTA ETTERPAFGFLGVIVVSLMGVLGL-KRKQREE

Figure 9. Comparaison des extrémités C-terminales des protéases de type Prt de différentes bactéries (*Lactococcus lactis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus paracasei*).

PrtP^a de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2

PrtP^b de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11

PrtP^c de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO763

Protéine A de *Staphylococcus aureus* (GI : 154736696)

Protéine M6 de *Streptococcus pyogenes* (GI : 50915065)

PrtB de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

PrtP^d de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NCDO151

La flèche verticale montre le site de clivage de la sortase A.

Les motifs d'ancrage LPxTG sont soulignés.

Les motifs d'ancrage dégénérés ne permettant pas le clivage sont encadrés. (Laan et Konings, 1989 ; Dieye *et al.*, 2010 ; Guss *et al.*, 1984 ; Banks *et al.*, 2004 ; Germond *et al.*, 2003 ; Holck et Naes, 1992).

3.3.1.3. Caractéristiques de PrtS

- 3.3.1.3.1. Mise en évidence de l'activité enzymatique pariétale

Une activité protéolytique de surface a été recherchée chez 97 souches de *S. thermophilus* et seules 3 d'entre elles ont présenté un niveau d'activité protéolytique équivalent à celui des lactocoques (Shahbal *et al.*, 1991). Ces trois souches présentaient une croissance plus rapide dans le lait que les autres souches testées. De plus, la croissance étant corrélée à une plus forte production d'acide lactique, ces souches étaient plus acidifiantes que les autres souches ne présentant pas d'activité protéolytique. Les propriétés biochimiques et le niveau d'activité protéolytique ont été comparés chez 2 souches fortement protéolytiques CNRZ385 et CNRZ703 (Shahbal *et al.*, 1993). La souche CNRZ385 présente une activité protéolytique de surface équivalente lorsque la croissance a lieu dans le lait ou en milieu M17, alors que la souche CNRZ703 présente 3 fois plus d'activité protéolytique dans le lait qu'en milieu M17.

La différence majeure existant entre ces deux milieux est la disponibilité de la source azotée sous forme de peptides et d'acides aminés qui est plus importante dans le milieu M17.

Récemment, une autre étude a été réalisée par Galia *et al.* (2009) à partir de 30 souches isolées de yaourts ou de fromages. L'activité protéolytique de surface, évaluée par zymographie, et les propriétés acidifiantes des 30 souches ont été recherchées. L'activité protéolytique a été détectée pour 12 souches, trois souches présentaient une faible activité et 15 autres souches en étaient dépourvues. Il est à souligner que toutes les souches présentant un fort potentiel protéolytique se développent bien en milieu lait et ont un fort pouvoir acidifiant.

- 3.3.1.3.2. Caractérisation de l'activité protéolytique pariétale : PrtS

La souche CNRZ385 a été sélectionnée pour isoler et caractériser la protéase de surface (Fernandez-Espla *et al.*, 2000). La protéase de paroi est ancrée de façon covalente à la paroi par son domaine d'ancrage présenté précédemment. Afin de décrocher les protéines ancrées à l'enveloppe cellulaire (CEP), différentes conditions ont été mises au point. Ainsi de nombreuses méthodes ont été appliquées en testant différents tampons, en utilisant notamment deux enzymes (le lysosyme et la mutanolysine), par actions mécaniques (billes de verre, poudre d'alumine, "presse de French"), et par sonication (Fira *et al.*, 2001 ; Tsakalidou *et al.*, 1999 ; Zevaco et Gripon, 1988 ; Monnet *et al.*, 1987 ; Ezzat *et al.*, 1987 ; Coolbear *et al.*, 1992 ; Binetti *et al.*, 2002 ; van de Guchte *et al.*, 1990 ; Khalid et Marth, 1990 ; Deutsch *et al.*, 2000 ; Atlan *et al.*, 1989 ; Miyakawa *et al.*, 1992 ; Shihata et Shah, 2000 ; Peng *et al.*, 2001 ; Scolari *et al.*, 2006 ; Mora *et al.*, 2005b ; Shahbal *et al.*, 1993). Fernandez-Espla *et al.* (2000), ont couplé deux méthodes, physique et enzymatique, avec la poudre d'alumine et le lysozyme. De plus, avant la récupération de l'enzyme, les bactéries ont été cultivées dans un milieu contenant 20 mM de glycine pour fragiliser la paroi. La poudre d'alumine, par action

mécanique, va permettre la lyse bactérienne, les débris récupérés après centrifugation sont ensuite mis en présence du lysozyme pendant deux heures. Le lysozyme permet la dégradation du peptidoglycane. Après centrifugation, l'extrait soluble renfermant une activité protéasique recherchée a été purifié. Avec cet extrait soluble, et après trois étapes de purification supplémentaires, la masse moléculaire de la protéase a été estimée par PAGE-SDS à 153 kDa (Fernandez-Espla *et al.*, 2000). Cette protéase a été caractérisée par dégradation d'Edman, l'obtention de la séquence aminotermine (19 résidus d'acides aminés) a permis d'identifier la protéase PrtS. La séquence ainsi obtenue a confirmé que la protéine ancrée à la paroi se trouve à l'état mature. Les mêmes auteurs ont ensuite déterminé la séquence du gène *prtS*. La taille du gène est de 4755 pb, la séquence protéique déduite est formée de 1585 résidus d'acides aminés. La masse moléculaire théorique de la préprotéase est de 169 kDa. Par homologie avec les autres protéases Prt répertoriées chez d'autres bactéries lactiques, la séquence protéique de PrtS a été divisée en 7 domaines (Figure 10, Tableau 7).

La protéase PrtS subit, après sa synthèse, différentes modifications aux extrémités N et C-terminales. La protéase est synthétisée sous forme de préprotéase. Au cours de l'excrétion, l'enzyme "signal peptidase", située au niveau de la membrane cellulaire, hydrolyse la séquence signal (SS). La proenzyme ainsi obtenue va subir une maturation en perdant le propeptide PP. Au niveau du domaine d'ancrage (AN) de l'extrémité C-terminale, le motif LPNTG de la protéase est reconnu par la sortase A. La sortase A va lier la protéase au peptidoglycane. Cette activité transpeptidasique sera détaillée dans la suite de cette partie.

- 3.3.1.3.3. Variabilité du gène *prtS*

Depuis ces dernières années, la séquence du gène *prtS* de différentes souches a été déterminée et différents allèles ont été obtenus : LMD-9, CNRZ385, JIM8232 (Figure 10) (Galia *et al.*, 2009 ; Delorme *et al.*, 2010). Toutes les séquences protéiques de protéase de paroi PrtS de *S. thermophilus* mais aussi celle de *S. suis* (SspA) présentent un fort pourcentage d'identité entre elles, de 95 à 100% (Galia *et al.*, 2009 ; Bonifait *et al.*, 2010a). La principale différence au niveau des séquences codantes des différents allèles *prtS* référencés à ce jour, correspond à une duplication imparfaite dans la région du propeptide qui est absente pour la souche CNRZ385 et présente pour toutes les autres souches de *S. thermophilus*. (Figure 10). Il est à souligner que cette duplication imparfaite n'est pas présente chez *S. suis*. Cette duplication pourrait être importante pour la maturation de la protéase (Galia *et al.*, 2009 ; Delorme *et al.*, 2010).

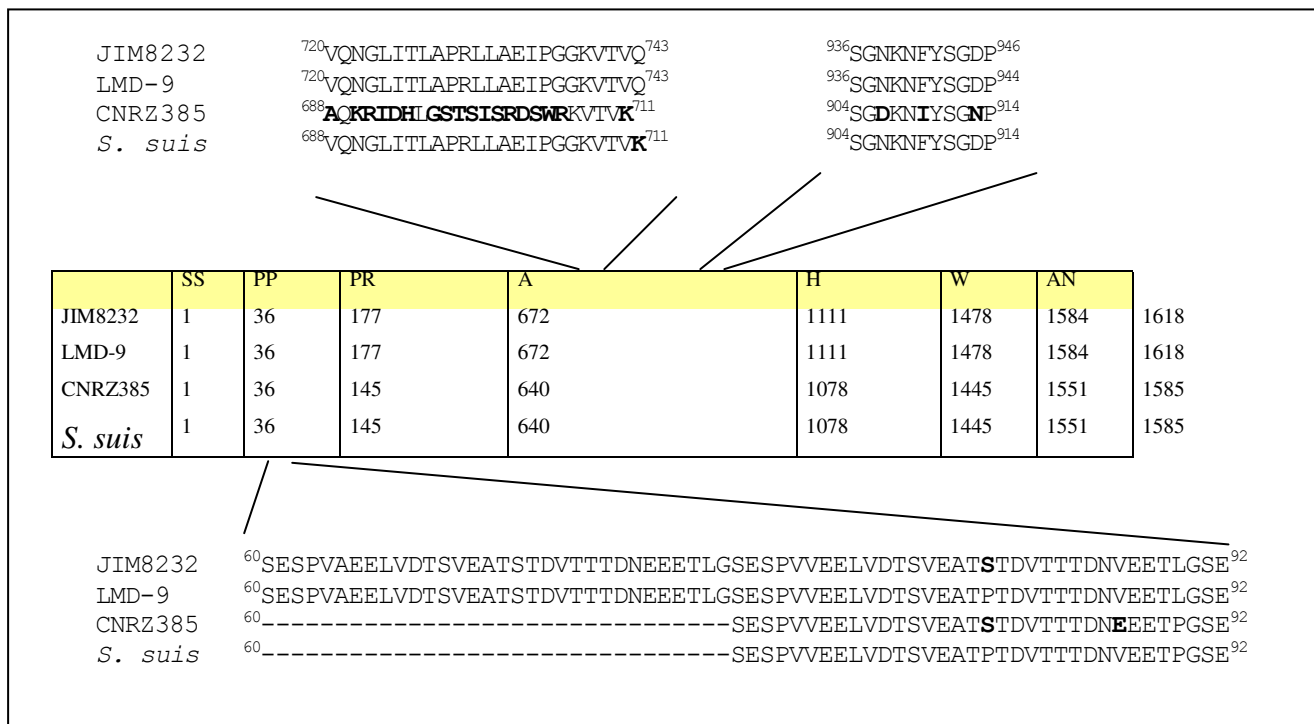


Figure 10. Représentation schématique de la structure de la protéase PrtS.

Structure en domaines et représentation des principales différences détectées entre les séquences protéiques de PrtS de *Streptococcus thermophilus* JIM8232 (GI:221047229), LMD9 (GI:116627664), CNRZ385 (GI:9963932) et *S. suis* 89/1591 (GI:81176989).

SS : séquence signal, PP Pré-Prodosome, PR domaine catalytique, A domaine globulaire, H domaine hélicoïdal, W "wall domain", AN domaine d'ancrage (Galia *et al.*, 2009, Delorme *et al.*, 2010)

Tableau 7. Comparaison du nombre de résidus d'acides aminés composant les différents domaines chez deux souches (CNRZ385 et LMD-9) de *Streptococcus thermophilus*.

Domaine	Nombre de résidus d'acides aminés	
	souche CNRZ385	souche LMD-9
SS : séquence signal	35	35
PP : propeptide	109	141
PR : domaine catalytique	495	495
A : domaine globulaire	438	439
H : domaine hélicoïdal	367	367
W : " wall domain"	106	106
AN : domaine d'ancrage	35	35

Au sein d'une collection de souches de *S. thermophilus*, la présence du gène *prtS* a été détectée chez 23 souches. En milieu M17, sur ces 23 souches, 15 souches présentaient une activité protéolytique, ainsi 8 souches ne présentant aucune activité protéolytique possèdent ce gène *prtS*. Le séquençage du gène *prtS* de quatre souches PrtS⁻ et de deux souches PrtS⁺ révèle une parfaite identité de séquence entre les souches, l'allèle *prtS* trouvé est celui de la souche LMD-9. Les auteurs concluent que l'absence d'activité PrtS chez certaines souches doit être due à une altération de la régulation du gène *prtS* (Galia *et al.*, 2009).

- 3.3.1.3.4. Caractéristiques enzymatiques de la protéase PrtS

La température optimale et le pH optimal d'activité de la protéase PrtS ont été déterminés en utilisant le substrat synthétique Ac-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA. Le maximum d'activité a été observé à pH 7,5 sur une gamme de pH comprise entre 5,5 et 8,5, et la température optimale d'activité déterminée est de 37°C (Shahbal *et al.*, 1993 ; Fernandez-Espla *et al.*, 2000).

La protéase PrtS est une protéase à sérine, elle est inhibée à 100% avec le PMSF (phénylméthylsulfonylfluorure) à 1 mM spécifique des protéases à sérine, et également inhibée par des inhibiteurs de protéases à cystéine comme l'acide iodoacétique à 1 mM (83% d'inhibition) et la chymostatine à 0,1 mM (75% d'inhibition) (Fernandez-Espla *et al.*, 2000).

De plus, l'activité de PrtS est augmentée par la présence de cations comme Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, K⁺ et Na⁺ et est inhibée par les cations Cu²⁺ et Zn²⁺ (Shahbal *et al.*, 1993). L'addition de CaCl₂ active fortement la protéase, de 2 à 10 fois, après addition de 2 à 10 mM de CaCl₂, respectivement. (Fernandez-Espla *et al.*, 2000).

- 3.3.1.3.5. Spécificité de coupure sur les caséines

L'hydrolyse de la caséine entière a été réalisée en présence de la protéase PrtS. La caséine β est dégradée plus rapidement que la caséine α_{s1} (Shahbal *et al.*, 1993 ; Fernandez-Espla *et al.*, 2000). Pour déterminer la spécificité de coupure, les auteurs ont utilisé le fragment 1-23 de la caséine α_{s1}. Ce fragment avait déjà été utilisé pour déterminer la spécificité de coupure d'autres protéases Prt de différentes bactéries lactiques (Figure 11). Ainsi pour *Lactococcus lactis* HP (Exterkate et Alting, 1999), PrtPI présentait des sites de coupures supplémentaires à ceux obtenus avec la protéase PrtPIII de la souche *L. lactis* AM1 (Exterkate *et al.*, 1991). La coupure observée chez certaines souches de *Lactobacillus helveticus* entre les résidus Ile 6 et Lys 7 n'a pas été observée chez *S. thermophilus* CNRZ385. Pour Fernandez-Espla *et al.* (2000), PrtS présente une activité de type PrtPI à pH 8 et une activité de type PrtPIII à pH 5,2. Le fragment 1-23 de la caséine α_{s1} est donc moins dégradé à pH 5,2 qu'à pH 8.

Souches	Caséine α_{s1} (f1-23)				
	5	10	15	20	
	R P K H P I K H Q G L P Q E V L N E N L L R F				
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> CRL 581		↑	↑↑	↑	↑
<i>Lb. helveticus</i> CNRZ32 (PrtH)				↑↑	
<i>Lb. helveticus</i> CNRZ32 (PrtH2)	↑	↑			
<i>Lb. helveticus</i> CNRZ303	↑	↑			
<i>Lb. helveticus</i> CP790	↑	↑			
<i>Lb. helveticus</i> L89		↑↑	↑	↑↑	↑
<i>Lc. lactis</i> HP (PrtPI)					
pH 6,5		↑↑	↑	↑↑	↑
pH 5,2			↑	↑↑	↑
<i>Lc. lactis</i> AM1 (PrtPIII)					
pH 6,5 et pH 5,2			↑	↑↑	↑
<i>S. thermophilus</i> CNRZ385 (PrtS)					
pH 8,0		↑↑	↑	↑↑	↑
pH 5,2				↑↑	↑

Figure 11. Spécificités de coupure de protéases Prt de bactéries lactiques sur le fragment (1-23) de la caséine α_{s1} .

Les flèches indiquent les sites de coupure.

Lb. delbrueckii subsp. *lactis* CRL 581 (Hebert *et al.*, 2008), *Lb. helveticus* CNRZ32 (Pederson *et al.*, 1999), *Lb. helveticus* CNRZ 303 (Zevaco and Gripon, 1988), *Lb. helveticus* CP790 (Ono *et al.*, 1997), *Lb. helveticus* L89 (Martin-Hernandez *et al.*, 1994), *Lc. lactis* HP (Exterkate et Alting, 1999), *Lc. lactis* AM1 (Exterkate *et al.*, 1991) et *S. thermophilus* CNRZ385 (Fernandez-Espla *et al.*, 2000).

- 3.3.1.3.6. Mécanisme catalytique de la protéase PrtS

Les trois résidus histidyl (His271), aspartyl (Asp205) et séryl (Ser600) de la triade catalytique de PrtS chez *S. thermophilus* LMD-9 doivent être correctement positionnés pour que la liaison OH du résidu séryl soit très fortement polarisée. La fonction imidazole du résidu histidyl va être protonée par le proton perdu de la fonction hydroxyle du résidu séryl. Le résidu séryl ainsi déprotoné attaque la liaison peptidique, deux peptides issus de l'hydrolyse sont obtenus. La fonction α -carboxylique du résidu se trouvant à l'extrémité C-terminale du premier peptide est reliée à la fonction hydroxyle du résidu séryl formant l'acyl-enzyme, et la fonction α -aminée du résidu se trouvant à l'extrémité N-terminale du deuxième peptide est reliée au résidu histidyl. Le deuxième peptide est libéré, le noyau imidazole du résidu histidyl arrache un proton à une molécule d'eau, l'ion hydroxyle formé va alors attaquer l'acyl enzyme pour libérer le premier peptide et obtenir la protéase active.

3.3.2. Protéases homologues à PrtS trouvées chez d'autres streptocoques pathogènes

La protéase de paroi PrtS appartient à la sous-famille subtilisines des protéases à sérine, elle est ancrée à la surface de la paroi *via* un motif LPXTG (Fernandez-Espla *et al.*, 2000).

Chez *S. thermophilus*, même si la protéase PrtS est similaire à celle des streptocoques pathogènes, elle n'a pas conservé la même fonction. Le rôle de cette protéase est de dégrader les caséines du lait en peptides assimilables comme chez les autres bactéries lactiques.

La protéase PrtS est similaire à d'autres protéases de paroi de streptocoques notamment à la peptidase C5a codée par le gène *scpA* (streptococcal C5a peptidase A) de *S. agalactiae* et *S. pyogenes*, et ce surtout au niveau des domaines PR, A et H (Fernandez-Espla *et al.*, 2000). La peptidase C5a est une protéase à sérine de 130 kDa, retrouvée ancrée à la surface des bactéries et qui serait responsable de la virulence (Cunningham, 2000).

Cette enzyme est impliquée dans le mécanisme d'échappement à la phagocytose utilisé par les streptocoques pour contourner la défense immunitaire de l'organisme infecté. En effet, cette peptidase va cliver la chimiotaxine C5a, ce qui inhibe le recrutement de cellules phagocytaires à un site d'infection. La peptidase C5a a été retrouvée chez les streptocoques du groupe A, B et G isolés chez des patients malades (Ji *et al.*, 1997).

Une autre équipe, celle de Husman *et al.* (1997), a comparé chez la souris la virulence d'un groupe de streptocoques sauvages portant la peptidase C5a à celle d'un groupe de mutants ne présentant pas la peptidase, suite à l'inactivation de son gène. Ils ont remarqué que l'inactivation du gène avait un léger impact sur l'incidence de la pneumonie. Cunningham (2000) a suggéré l'élaboration d'un vaccin contenant la peptidase C5a qui protégerait contre les infections par certains streptocoques. Un vaccin a été breveté dès 1998 et 5 autres ont été développés entre 2001 et 2009 (Cleary, 2001, US Patent 6270775; Cleary et Staflien, 2002, US Patent 6355255 ; Cleary et Staflien, 2005, US Patent 6951653 ; Cleary et Staflien, 2007, US Patent 7256265 ; Cleary et Staflien 2009 US Patent 7635483–Streptococcal C5a peptidase vaccine).

3.3.3. SspA : protéase homologue à PrtS de *Streptococcus suis*

PrtS est très similaire à la protéase de paroi de *S. suis* appelée SspA (surface-associated subtilisin-like serine protease) puisque les deux protéases possèdent 95,9% d'identité sur l'ensemble de la séquence protéique. La protéase SspA est fréquemment retrouvée chez les différentes souches testées. Le gène *sspA* est présent chez 29 sérotypes sur 33 de référence et est exprimé à la surface des bactéries (Hu *et al.*, 2010).

S. suis est une bactérie pathogène pour les porcs (mais également pour les hommes), c'est un agent zoonotique qui exprime de nombreux facteurs de virulence. Ce streptocoque (essentiellement sérotype 2) provoque des septicémies, méningites et endocardites, et est responsable d'énormes pertes économiques dans l'industrie du porc. De nombreux travaux ont été réalisés durant ces dernières

années pour comprendre le mode d'action des différents facteurs de virulence. Parmi eux, la protéine SspA a été incriminée. En effet, il a été observé que des mutants déficients en activité SspA sont moins virulents sur le modèle animal (souris et porc) que les souches parentes. Ces travaux indiquent que la protéase SspA contribue à la pathogénicité de cette espèce bactérienne (Bonifait *et al.*, 2010a ; Hu *et al.*, 2010). Récemment Bonifait *et al.* (2010b) ont cloné, purifié et caractérisé la protéase SspA chez la souche de *S. suis* P1/7 du serotype 2. La protéase recombinante est repérable par une plage de lyse en zymographie (en utilisant de la gélatine comme substrat contenu dans le gel) à 170 kDa. L'activité optimale de la protéase recombinante se situe à pH 7 et dans une gamme de température comprise entre 25 et 37°C. Cette protéase a une spécificité élevée pour le substrat Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA. Les inhibiteurs spécifiques aux protéases à sérine altèrent son activité. Cette protéase est active contre la chaîne A α du fibrinogène. De plus, lorsque la protéase est incubée avec le fibrinogène, il n'y a pas de formation de fibrine, contrairement à son homologue "subtilisin C5a peptidase" produite par *S. pneumoniae* (Harris *et al.*, 2003). En absence de SspA, la thrombine transforme le fibrinogène en fibrine ; la présence de SspA (dose dépendante) empêche la formation de fibrine. L'incapacité de former la fibrine pourrait jouer un rôle dans la virulence de *S. suis*. En effet, SspA peut faciliter l'entrée de *S. suis* dans les vaisseaux sanguins et promouvoir les septicémie, méningite et endocardite chez les porcs, mais aussi chez l'Homme. De plus SspA de *S. suis* est un des facteurs immunogéniques principaux, et pourrait être le candidat prometteur pour faire un vaccin "protein-based" (Bonifait *et al.*, 2010b).

4. Ancrage de la protéase PrtS à la paroi

La paroi cellulaire des bactéries à Gram⁺ ne joue pas seulement le rôle de cytosquelette mais permet également d'avoir des interactions entre les bactéries et l'environnement (Ghuysen et Hakenbeck, 1994). Le peptidoglycane est lié de façon covalente ou non à des acides teichoïques, des polysaccharides et des protéines. Ces molécules confèrent des propriétés spécifiques aux espèces ou à certaines souches bactériennes, et peuvent être responsables de la virulence bactérienne, de l'interaction avec le système immunitaire de l'hôte, et du développement de symptômes de certaines maladies (Marraffini *et al.*, 2006). Il existe différents types de protéines de surface, avec différents modes de fixation (Figure 12). Les protéines de surface peuvent interagir avec les acides téichoïques ou lipotéichoïques (Höltje et Tomasz, 1975 ; Jonquières *et al.*, 1999), s'insérer dans la membrane plasmique *via* une ancre membranaire qui a une structure alpha-hélicoïdale (Koks *et al.*, 1992) ou *via* une modification de l'extrémité N-terminale contenant un diacyl glycérol (BlaZ de *Staphylococcus aureus*) (Nielsen et Lampen, 1982 ; Navarre *et al.*, 1996). Enfin, les protéines peuvent être ancrées à la paroi de façon covalente *via* un "sorting signal", ce motif est reconnu par une enzyme nommée sortase qui catalyse une réaction de transpeptidation (Schneewind *et al.*, 1992).

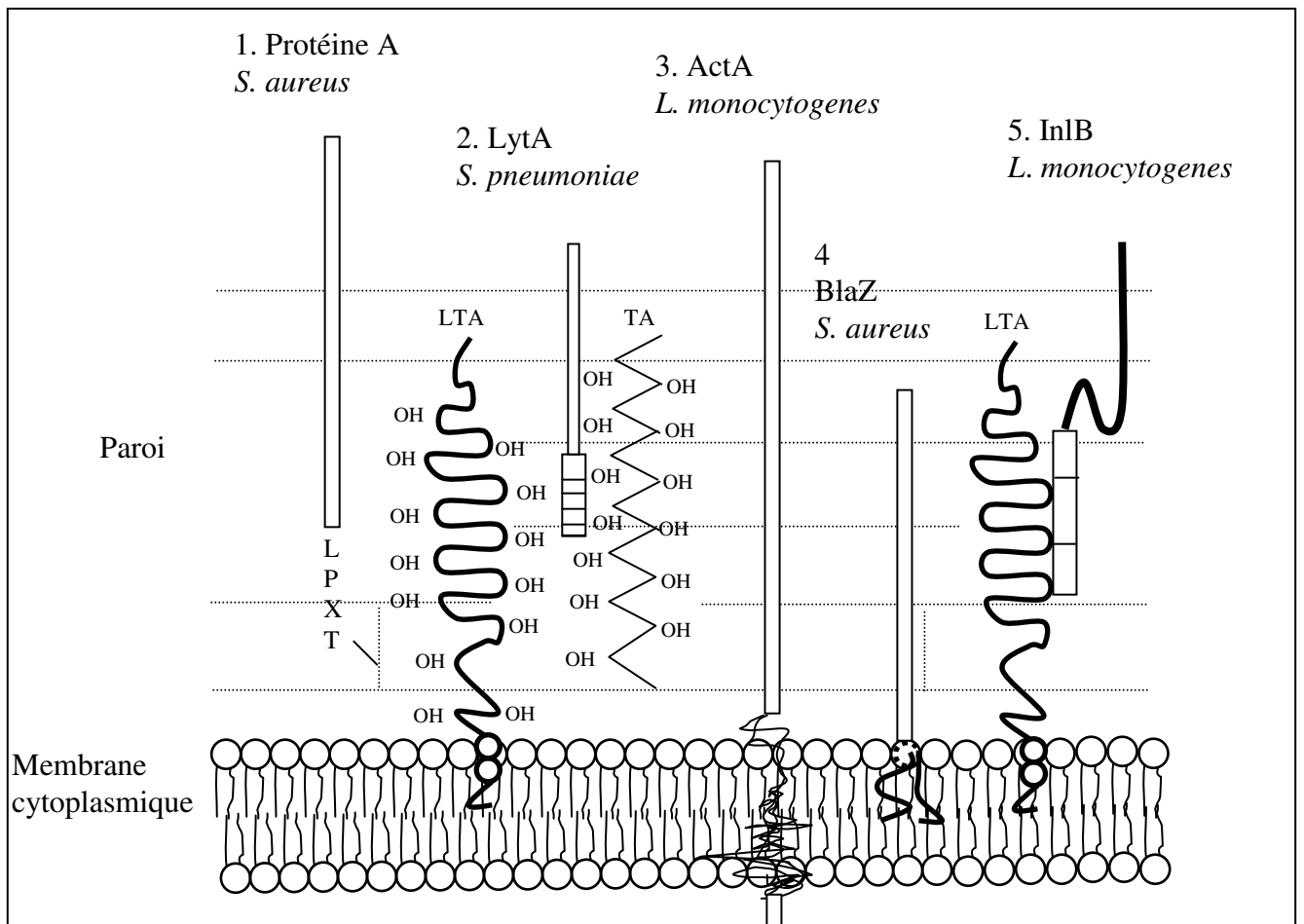


Figure 12. Différents modes de fixation de protéines de surface chez des bactéries à Gram⁺ (Cossart et Jonquière, 2000).

1. Liaison covalente à la paroi cellulaire : protéine A, ou "immunoglobulin-binding protein" de *Staphylococcus aureus* (Schneewind *et al.*, 1992). **2.** Faibles interactions entre la protéine et les acides téichoïques résidus (TA) et les acides lipotéichoïques (LTA) de la choline : amidase LytA de *Streptococcus pneumoniae* (Höltje et Tomasz, 1975). **3.** Ancrage membranaire d'ActA ou "actin-polymerizing protein" de *Listeria monocytogenes* (Kocks *et al.*, 1992) **4.** La β -lactamase, BlaZ (gène porté par le plasmide de résistance PI258 de *Staphylococcus aureus*) est associée à la membrane et partiellement relarguée dans le milieu (Wang et Novick, 1987) **5.** La protéine InlB (internalin B) de *L. monocytogenes* est faiblement attachée aux acides lipotéichoïques (Braun *et al.*, 1997 ; Jonquière *et al.*, 1999).

4.1. Sortases

Les sortases catalysent une réaction de transpeptidation tout d'abord sur la protéine de surface au niveau du "sorting motif". Les acyl enzymes intermédiaires formées entre les sortases et leurs substrats sont résolues par l'attaque nucléophile d'une fonction amine, provenant d'un précurseur du peptidoglycane, libérant la sortase et liant la protéine de surface au peptidoglycane. Les protéines ancrées à la paroi sont des protéines de surface ayant des fonctions cellulaires importantes. Elles permettent l'adhésion, l'invasion, le signalement, l'interaction avec le système immunitaire de l'hôte ou avec l'environnement. Il existe différentes classes de sortases (Tableau 8).

Tableau 8. Différentes classes de sortases chez les bactéries à Gram positif (Comfort et Clubb, 2004 ; Dramsi *et al.*, 2005 ; Oxaran *et al.*, 2010).

Classe de sortase	Motif et site de clivage	Bactéries
A	LPkT-Ge	<i>Bacillus</i> , <i>Listeria</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Enterococcus</i> <i>Streptococcus</i>
B	NPqt-nd	<i>Streptococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Listeria</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Clostridia</i>
C	L(I)PkT-GG	<i>Actinobacteria</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Clostridia</i> , <i>Lactococcus lactis</i>
D	LPnT-At, LAeT-Ga	<i>Bacillus</i> , <i>Actinobacteria</i>

Chaque sortase permet de fixer des protéines ayant un "sorting motif" spécifique. Par exemple, deux sortases (SrtA et SrtB) ont été caractérisées chez *Staphylococcus aureus* qui reconnaissent des motifs spécifiques LPXTG et NPQTN respectivement (Peacock *et al.*, 1999 ; Foster et McDevitt, 1994 ; Navarre et Schneewind, 1999). Récemment, Dieye *et al.* (2010) et Oxaran *et al.* (2010) ont rapporté qu'il existe également des sortases de Classe C qui reconnaissent des protéines pilines possédant un motif LPXTG ainsi qu'un motif piline, VYPK chez la souche *L. lactis* IL1403.

Le mécanisme d'ancrage de PrtS à la paroi n'a pas été étudié chez *S. thermophilus* mais a été déduit du mécanisme étudié chez de nombreuses bactéries à Gram⁺, notamment chez *Staphylococcus aureus* et chez de nombreux streptocoques pathogènes.

4.2. Sortase A

Les substrats de la sortase A sont le peptidoglycane et les protéines à ancrer.

4.2.1 Structure du peptidoglycane

Bien que la structure du peptidoglycane varie d'une espèce à l'autre, plusieurs éléments structuraux ou fonctionnels sont conservés. Les brins glycaniques de tous les peptidoglycanes bactériens sont constitués de répétitions d'unités dissaccharidiques N-acétyl glucosamine (β 1-4)-d'acide N-acétylmuramique (GlcNac-MurNAc). Les chaînes glycaniques sont reliées par de petits peptides, générant un réseau moléculaire tridimensionnel qui maintient l'intégrité de la bactérie. La fonction amine du premier acide aminé de ces peptides est liée au groupe carboxylique de l'acide lactique de l'acide N-acétylmuramique formant une liaison amide. La biosynthèse du peptidoglycane a lieu dans le cytoplasme bactérien et dans les compartiments membranaires et pariétaux. Après la synthèse dans le cytoplasme, les précurseurs nucléotidiques (Park's nucleotide) forment une liaison phosphodiester avec un transporteur undécaprénol appelé le lipide I et ensuite la N-acétylglucosamine y est attachée pour former le lipide II. Finalement, après polymérisation de sous-unités de lipide II *via* des réactions de transglycosylation et de transpeptidation, le peptidoglycane est obtenu formant la paroi cellulaire (Figure 13). Ce peptidoglycane lié constitue l'élément principal de la paroi cellulaire.

4.2.2. Protéines à ancrer au peptidoglycane

La protéine à ancrer au peptidoglycane est synthétisée au niveau du cytoplasme, et est exportée vers l'extérieur de la cellule. La séquence signal localisée à l'extrémité N-terminale est reconnue par une "signal peptidase" puis éliminée. La protéine, se retrouvant à l'extérieur, est retenue transitoirement dans la membrane cellulaire par un domaine hydrophobe (composé de 20 résidus d'acides aminés) et une queue chargée positivement. Le motif d'ancrage LPXTG dans la protéine étant bien positionné par rapport à la sortase, la transpeptidation peut avoir lieu.

Le lipide II du peptidoglycane et la protéine à ancrer sont les substrats de la sortase. L'enzyme utilise le groupe amino libre du pont peptidique du peptidoglycane pour former une liaison amide avec la fonction carboxylique produite par le clivage du motif d'ancrage de la protéine à ancrer. Ainsi, l'activité de la sortase peut être considérée comme une transpeptidation entre le lipide II et la protéine de surface (Figure 14) (Ton-That *et al.*, 2004).

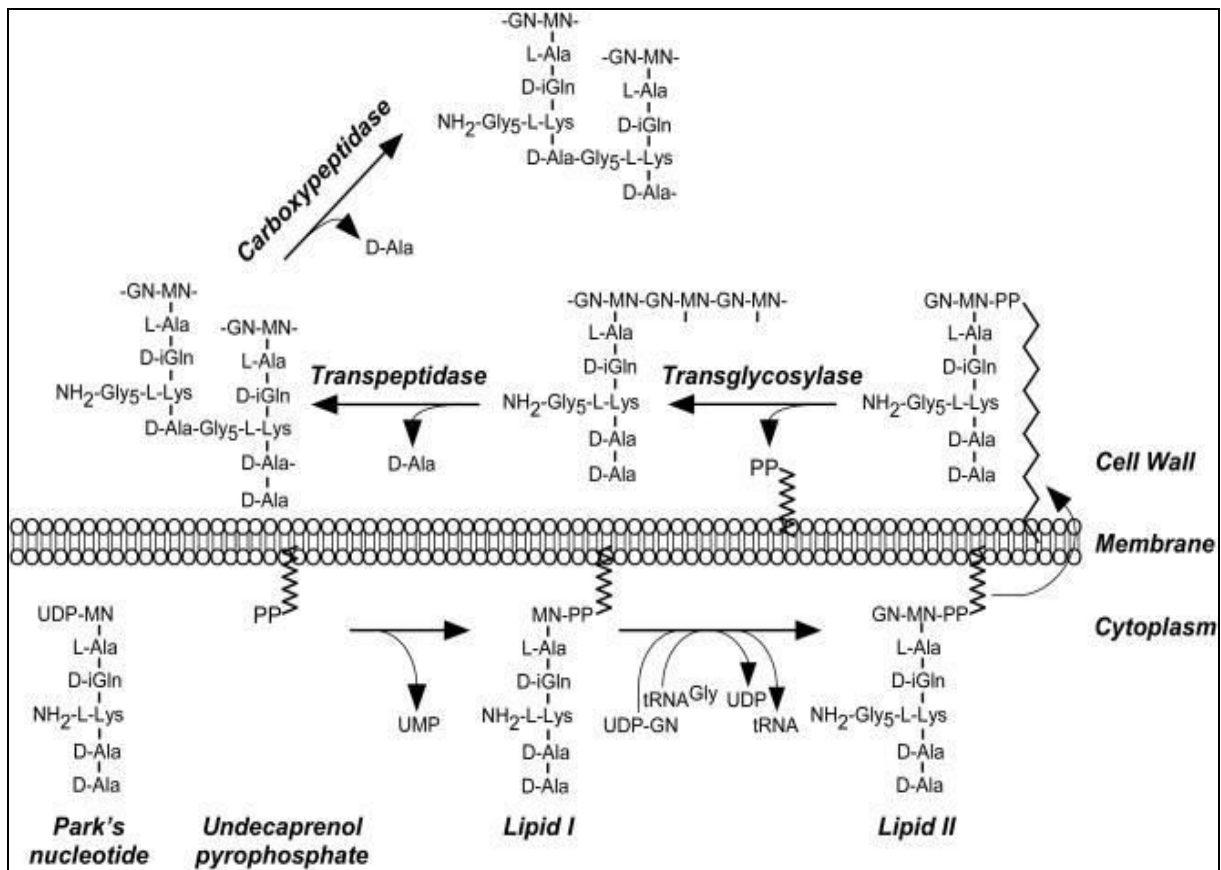


Figure 13. Synthèse du peptidoglycane chez *Staphylococcus aureus* (Marraffini *et al.*, 2006).

Après la synthèse dans le cytoplasme du précurseur nucléotidique (Park's nucleotide), il forme une liaison phosphodiester avec le undécaprénol pyrophosphate pour donner le lipide I. Ensuite la N-acétylglycosamine y est attachée pour former le lipide II. Ce lipide II se retrouve vers l'extérieur de la cellule. Après polymérisation de sous-unités de lipide II *via* des réactions de transglycosylation et de transpeptidation et de carboxypeptidase, le peptidoglycane est obtenu.

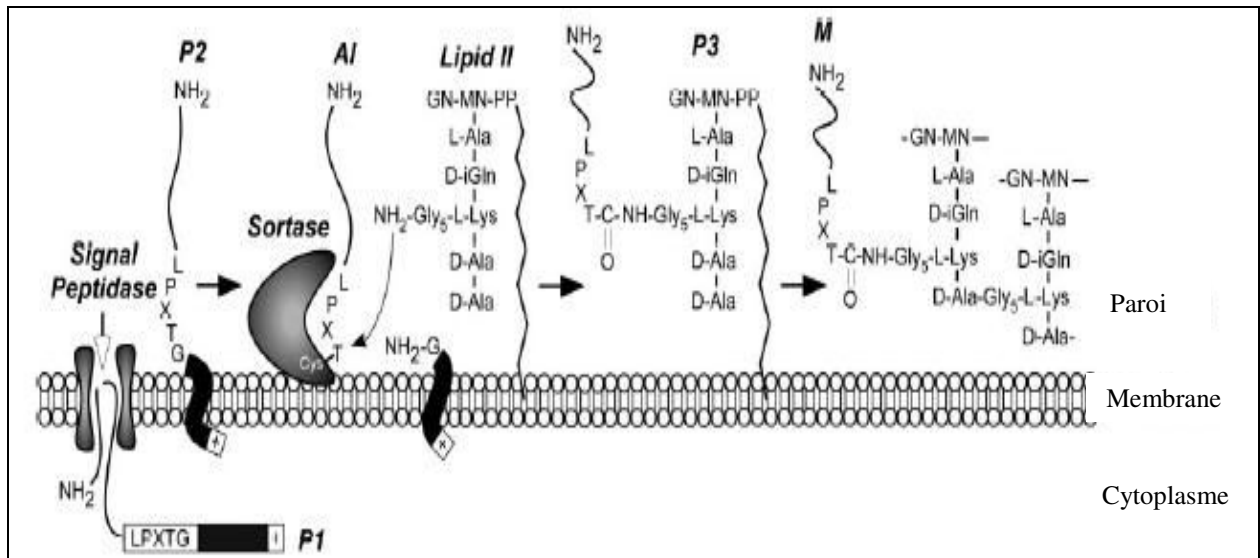


Figure 14. Voie d'excrétion et d'ancrage à la paroi cellulaire des protéines de surface des bactéries à Gram⁺ par la sortase A (Marraffini *et al.*, 2006).

Les protéines de surface sont dans un premier temps, synthétisées dans le cytoplasme sous la forme d'un précurseur entier (P1) contenant une séquence signal amino-terminale et un domaine d'ancrage carboxy-terminal. La séquence signal dirige l'exportation du polypeptide à travers le système Sec et, après la translocation, est clivée par l'enzyme "signal peptidase". Le produit de cette réaction, appelé précurseur P2 est retenu au moment de la sécrétion *via* son domaine C-terminal hydrophobe et sa queue chargée positivement. La sortase, transpeptidase liée à la membrane avec un résidu de cystéine présent dans le site actif, clive la liaison peptidique entre les résidus de thréonine (T) et de glycine (G) du motif LPXTG, générant un acyl intermédiaire (AI). Le lipide II, précurseur de la biosynthèse du peptidoglycane, *via* la fonction amine de son pont de pentaglycine (Gly₅) attaque l'acyl intermédiaire, liant le résidu de thréonine de la protéine de surface au lipide II (P3). Le précurseur P3 est incorporé à la paroi cellulaire pour générer une protéine mature de surface ancrée (M). Le site actif de la sortase est ainsi régénéré.

L'activité transpeptidasique de SrtA se déroule en deux étapes. La première étape correspond à l'hydrolyse de la liaison entre les résidus de thréonine et de glycine du motif LPXTG permettant l'élimination du domaine C-terminal de la protéine. Au cours de la deuxième étape, la sortase liée à la protéine par la fonction carboxylique du résidu de thréonine va catalyser la formation d'une liaison amide entre ce résidu de thréonine et une fonction amine d'un résidu de glycine du peptidoglycane. La protéine sera ainsi ancrée et la sortase de nouveau opérationnelle (Figure 14).

Pour libérer la protéine A ancrée à la paroi de *Staphylococcus aureus*, les auteurs ont testé différentes enzymes notamment la lysostaphine, une glycyglycine endopeptidase qui clive le pentaglycyl du pont croisé du peptidoglycane, et le lysozyme, une N-acétylmuramidase qui coupe le brin glycanique du peptidoglycane. Ces enzymes permettent un relargage des molécules protéiques liées à un morceau de peptidoglycane plus ou moins important en fonction de l'endroit où se situe la lyse enzymatique (Ton-That *et al.*, 2004). Chez des mutants de *Staphylococcus aureus* où le gène codant la protéine A a été tronqué de la partie codant le "sorting signal", la protéine A n'est plus ancrée, et se retrouve libre dans le milieu extracellulaire. Par contre, si des mutations sont réalisées au niveau du motif LPXTG, la liaison covalente entre la protéine mutante et le peptidoglycane ne peut se faire mais la protéine est retenue au niveau membranaire *via* les interactions entre la membrane et la queue chargée de la protéine (Ton-That *et al.*, 2004).

4.2.3. La sortase A chez *S. thermophilus*

Un seul gène de sortase, le gène *srtA*, a été retrouvé sur le génome de *S. thermophilus*. D'après sa séquence, ce gène semble fonctionnel chez la souche LMD-9 qui possède le gène *prtS*, et est tronqué chez les souches CNRZ1066 et LMG18311 qui ne possèdent pas le gène *prtS* (Delorme *et al.*, 2010).

Pour la protéase PrtS de *S. thermophilus*, le domaine d'ancrage contenant le motif est composé de la séquence peptidique LPNTG. Cette séquence serait reconnue par la sortase A qui lierait la protéase au peptidoglycane (Fernandez-Espla *et al.*, 2000). De plus, en aval de ce motif se trouve une séquence composée de résidus d'acides aminés chargés et hydrophobes qui permettraient des interactions avec la membrane cytoplasmique. Cette structure est impliquée dans l'arrêt de la translocation de la protéase et permet à la sortase A de remplir son rôle de transpeptidase.

4.3. Structure de la sortase A et mécanisme réactionnel

La sortase A chez *St. aureus* est une enzyme composée de 206 résidus d'acides aminés. Par analyse en RMN, la structure tridimensionnelle a révélé une structure en tonneau β composée de 8 brins β , où les brins $\beta 7$ et $\beta 8$ forment le site actif. Dans ce site actif sont retrouvés les résidus d'acides aminés importants pour l'activité enzymatique, à savoir, les résidus de cystéine, d'histidine et

d'arginine. La sortase hydrolyse le motif LPXTG entre les résidus de thréonine et de glycine et ce à la fois *in vivo* et *in vitro*. La fonction carboxylique du résidu de thréonine forme une liaison thioester avec le résidu de cystéine du site catalytique de la sortase. La catalyse est complétée par l'attaque nucléophile de la fonction amine libre du peptide du lipide II (Marrafini *et al.*, 2006).

Chez *S. pyogenes*, la structure tridimensionnelle de la sortase A est une structure en tonneau β avec 8 brins également. La triade catalytique est aussi constituée des résidus His¹⁴², Cys²⁰⁸ et Arg²¹⁶ (Race *et al.*, 2009).

4.4. Localisation de la sortase au niveau membranaire

Chez *Staphylococcus aureus*, l'extrémité N-terminale hydrophobe de la sortase fonctionne comme un peptide signal pour la sécrétion, et comme un signal d'arrêt du transfert pour l'ancrage à la membrane. Sa localisation membranaire a été confirmée expérimentalement lors d'analyses d'immunoblotting sur différentes fractions subcellulaires (Mazmanian *et al.*, 2000). L'enzyme adopte une topologie membranaire de type II avec l'extrémité N-terminale dans le cytoplasme et l'extrémité C-terminale contenant le site actif qui traverse la membrane plasmique (Ilango *et al.*, 2001).

4.5. Rôle de la sortase A chez différents streptocoques

4.5.1. *Streptococcus pyogenes*

Chez *Streptococcus pyogenes*, bactérie pathogène pour l'homme (responsable de septicémie, pneumonie, pharyngite), de nombreux facteurs de virulence sont ancrés à la paroi par la sortase A (protéine M, protéine F, C5a peptidase et GRAB-G-related α 2-macroglobulin binding protein) (Hollingshead *et al.*, 1986 ; Sela *et al.*, 1993 ; Chen and Cleary, 1990 ; Rasmussen *et al.*, 1999). Ces protéines ne sont pas ancrées à la paroi lorsque le gène *srtA* a été interrompu, elles sont libérées dans le milieu de culture, et la virulence est diminuée (Barnett et Scott, 2002). La sortase A est localisée au niveau membranaire (Raz et Fischetti, 2008).

4.5.2. Streptocoques oraux

Chez des streptocoques oraux, plusieurs protéines de surface ancrées à la paroi cellulaire sont impliquées dans l'attachement de la bactérie à la surface des dents (Mitchell, 2003). Ainsi, la protéine de surface P1 (connue aussi sous le nom d'antigène I/II ou Pac) est une adhésine initiant la colonisation bactérienne des surfaces dentaires par liaison à l'agglutinine salivaire, glycoprotéine qui couvre les dents. La séquence de la protéine P1 comporte un peptide signal N-terminal et a un motif d'ancrage LPXTG à l'extrémité C-terminale. L'ancrage à la paroi cellulaire et l'expression à la surface de P1 nécessitent le gène *srtA* de *S. mutans*. La délétion du gène *srtA*, provoque chez les

mutants la libération de la protéine P1 dans le milieu de culture. La sortase A est localisée au niveau membranaire (Igarashi *et al.*, 2003 ; Lee et Boran, 2003).

4.5.3. *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae, pathogène pour l'homme, colonise le nasopharynx et les voies respiratoires et est la cause d'otite, de pneumonie, de bactériémie et de méningite (Hollingshead *et al.*, 1986). Comme pour beaucoup d'autres pathogènes à Gram positif, plusieurs protéines de surface contenant le motif LPXTG sont des facteurs de virulence. Ainsi, la hyaluronidase (HylA) et la neuraminidase (NanA), enzymes glycolytiques qui dégradent les polysaccharides dans la matrice extracellulaire, sont ancrées (Mitchell, 2003). Lorsque le gène *srtA* est interrompu, l'ancrage des protéines ne peut avoir lieu. De plus la virulence sur des modèles animaux est moindre chez des mutants *srtA* (Kharat et Tomasz, 2003).

4.5.4. Autres streptocoques

Chez d'autres streptocoques, le rôle de la sortase A a également été démontré comme intervenant dans l'ancrage de différents facteurs de virulence. C'est le cas pour *S. sanguinis*, bactérie retrouvée au niveau de la cavité buccale, avec un faible pouvoir cariogène et qui est fréquemment isolée de patients atteints d'endocardites (Yamaguchi *et al.*, 2006). C'est aussi le cas pour *S. agalactiae* responsable d'infections néonatales sévères (Lalioui *et al.*, 2005) et pour *S. uberis*, pathogène pour les bovins, qui provoquent des mammites et engendrent des impacts négatifs sur la santé animale et sur la production du lait (Leigh *et al.*, 2010 ; Egan *et al.*, 2010). Chez tous ces pathogènes, les mutants *srtA* sont moins virulents que le sauvage.

De plus, récemment, en mutant le gène *srtA* de nombreux travaux ont été menés chez différents streptocoques (*S. suis* : Osaki *et al.*, 2002, *S. gordonii* : Nobbs *et al.*, 2007 ; Davies *et al.*, 2009), pour connaître les protéines de surface ayant un rôle dans la virulence. Les protéines relarguées dans le milieu ont ensuite été séparées par électrophorèse bidimensionnelle, les spots protéiques ont subi une hydrolyse trypsique, la masse de chaque peptide a été déterminée par spectrométrie de masse. Les protéines ancrées ont pu être ainsi caractérisées.

4.6. Inactivation de la sortase

Certains antibiotiques comme la vancomycine et la moenomycine, des inhibiteurs de la polymérisation de la paroi cellulaire, ralentissent la réaction d'ancrage ("sorting reaction"). Ces antibiotiques n'interfèrent pas directement avec cette réaction d'ancrage mais changent la concentration en précurseur de peptidoglycane. De plus, sachant que de nombreuses espèces pathogènes sont résistantes aux antibiotiques, il est nécessaire d'empêcher les facteurs de virulence d'être ancrés, puisque de nombreuses études ont prouvé la diminution de la virulence quand la sortase

est mutée ou délétée. Dans ce but, différents inhibiteurs de sortases de diverses origines chimiques, végétales, ont été testés (Tableau 9). L'absence de la réaction de transpeptidation chez des souches sauvages (*srtA*⁺) sous l'action de molécules inhibitrices, aboutit à la libération des facteurs de virulence et à une diminution de la virulence. Cette situation rappelle celle observée chez des souches mutantes *srtA*⁻.

Tableau 9. Différents inhibiteurs de sortases de *Staphylococcus aureus*.

Inhibiteur de la sortase	Références bibliographiques
MTSET (2-triméthylammonium éthyl) méthane thiosulfate	Maraffini <i>et al.</i> , 2006
pHMB (acide p-hydroxymercuribenzoïque)	
Extraits de plantes médicinales (<i>Cocculus trilobus</i> , <i>Fritillaria verticillata</i> , <i>Liriope platyphylla</i> et <i>Rhus verniciflua</i>)	Kim <i>et al.</i> , 2002
Alcaloïdes Bis-indolique (isolés à partir d'une éponge marine : <i>Spongisorites</i>)	Oh <i>et al.</i> , 2005
Curcumine <i>Curcuma longa</i> L.	Park <i>et al.</i> , 2005
Flavonols	Kang <i>et al.</i> , 2006

Objectifs du travail :

Mise en évidence d'une forme extracellulaire de PrtS chez *Streptococcus thermophilus*.

Le système protéolytique de *S. thermophilus*, composé d'une protéase de paroi, de systèmes de transport de peptides et de peptidases intracellulaires hydrolysant les peptides incorporés est le principal acteur dans la formation et/ou la disparition des peptides bioactifs d'intérêt dans le lait fermenté. L'aptitude de *S. thermophilus* à croître rapidement dans le lait variant fortement d'une souche à l'autre implique une variabilité d'au moins une partie de son système protéolytique.

Au cours de ces travaux, nous nous sommes focalisés sur la capacité protéolytique extracellulaire de *S. thermophilus*. Ainsi, dans une première partie, parmi 30 souches testées, nous avons mis en évidence une forme libre d'une protéase extracellulaire uniquement chez la souche 4F44. Cette enzyme a été identifiée et caractérisée comme étant la protéase PrtS.

En deuxième partie de nos travaux, nous proposons différentes hypothèses pour expliquer les raisons pour lesquelles cette protéase de type PrtS, uniquement ancrée chez d'autres souches, est retrouvée également sous forme soluble pour *S. thermophilus* 4F44.

Enfin, le surnageant de culture contenant la protéase libre a été utilisé pour hydrolyser les caséines bovines. La spécificité de coupure de cette activité enzymatique a également été déterminée.

Matériels et Méthodes

1. Souches bactériennes et conditions de culture

Les souches de *S. thermophilus* étudiées font partie de la collection du laboratoire. Ces souches d'origines diverses (yaourt ou fromage, collection CNRZ et ATCC) sont stockées au laboratoire dans du lait reconstitué à 10%, à -80°C. Elles ont été classées en fonction de leurs capacités acidifiantes en 3 groupes (Galia *et al.*, 2009) et sont présentées dans le tableau 10.

Pour les expérimentations, elles sont cultivées à 42°C sur milieu M17 (Terzaghi et Sandine, 1975) ou YL modifié (Morice *et al.*, 1992, Jameh communication personnelle) (Tableau 11). Le milieu YL modifié a été utilisé pour récupérer la protéase libre dans un milieu extracellulaire à pH 6,2 après 16 h de croissance.

Chaque souche est pré-cultivée dans le lait pendant 1 nuit à 42°C puisensemencée à 1% dans le milieu M17 en présence de 2% de lactose (Tableau 11). La croissance est suivie par mesure de la densité optique à 650 nm et du pH.

2. Extraction de PrtS de la paroi des bactéries

Dans le protocole de Galia *et al.* (2009) les culots cellulaires récupérés après la centrifugation à 3 900 g durant 15 min à 4°C ont été lavés 3 fois dans un tampon de phosphate de sodium 50 mM pH 7 et soumis à 3 centrifugations successives dans les mêmes conditions. Ils ont ensuite été congelés au moins 3h à -20°C. Ces culots cellulaires ont été remis en suspension dans le même tampon, soumis à une première sonication (3 fois 1 min, 100W, avec un cycle actif de 50% ; sonicateur Vibra-cell 600 W, Bioblock scientific, Ilkirch, France) afin de casser les cellules. Une centrifugation à 12 000 g pendant 10 min à 4°C a permis de séparer les débris cellulaires et les contenus intracellulaires. Les débris cellulaires ont ensuite subi un deuxième traitement de sonication (1 fois 1 min, 100W avec un cycle actif de 50%) dans un tampon de phosphate de 50 mM, pH 7 contenant 10% SDS (concentration finale). Une nouvelle centrifugation à 12 000 g, 10 min à 4°C a permis de séparer la fraction enzymatique pariétale du culot de débris membranaires. Tous ces échantillons ont été conservés à -80°C. Au début du présent travail, le protocole a été optimisé afin de disposer d'une fraction de protéase pariétale de *S. thermophilus* qui a servi de référence dans les expérimentations ultérieures. Les conditions de récupération des bactéries, de sonication, de lavage des culots, de concentration finale de SDS ont été revues et le protocole optimisé est présenté dans la figure 15.

Tableau 10. Souches de *Streptococcus thermophilus* utilisées dans ce travail.

Leurs caractéristiques en termes de pouvoir acidifiant, de présence du gène *prtS* et d'expression de ce gène sont également indiquées (Galia *et al.*, 2009).

Souches (génomé séquencé)	Origine	Possède (+) ou non (-) le gène <i>prtS</i>	Détection (+) ou non (-) d'activité caséinolytique de PrtS pariétale
Capacité acidifiante faible			
CNRZ21	Yaourt	<i>prtS</i> ⁻	PrtS ⁻
CNRZ307	Fromage	<i>prtS</i> ⁻	PrtS ⁻
Capacité acidifiante moyenne			
CNRZ1066 (Bolotin <i>et al.</i> , 2004)	Yaourt	<i>prtS</i> ⁻	PrtS ⁻
PB180	Fromage	<i>prtS</i> ⁺	PrtS ⁻
ATE11PB6	Yaourt	<i>prtS</i> ⁺	PrtS ⁻
ST19	Yaourt	<i>prtS</i> ⁺	PrtS ⁻
PB5	Yaourt	<i>prtS</i> ⁻	PrtS ⁻
HAD8 α	Yaourt	<i>prtS</i> ⁺	PrtS ⁻
CNRZ445	Fromage	<i>prtS</i> ⁺	PrtS ^{+/-}
ST20	Yaourt	<i>prtS</i> ⁺	PrtS ⁻
CNRZ160	Yaourt	<i>prtS</i> ⁻	PrtS ⁻
ST14	Yaourt	<i>prtS</i> ⁻	PrtS ⁻
CNRZ407	Yaourt	<i>prtS</i> ⁺	PrtS ⁻
CNRZ404	Yaourt	<i>prtS</i> ⁺	PrtS ^{+/-}
HAD17	Yaourt	<i>prtS</i> ⁺	PrtS ⁻
CNRZ308	Fromage	<i>prtS</i> ⁺	PrtS ⁻
CNRZ302	Fromage	<i>prtS</i> ⁻	PrtS ⁻
ATCC19258	Lait Pasteurisé	<i>prtS</i> ⁺	PrtS ^{+/-}
Capacité acidifiante forte			
ST85	Fromage	<i>prtS</i> ⁺	PrtS ⁺
ST80	Fromage	<i>prtS</i> ⁺	PrtS ⁺
ST88	Fromage	<i>prtS</i> ⁺	PrtS ⁺
ATE19PB8	Yaourt	<i>prtS</i> ⁺	PrtS ⁺
ST87	Fromage	<i>prtS</i> ⁺	PrtS ⁺
PB18	Fromage	<i>prtS</i> ⁺	PrtS ⁺
Y4	Yaourt	<i>prtS</i> ⁺	PrtS ⁺
LMD-9 (Makarova <i>et al.</i> , 2006)	Yaourt	<i>prtS</i> ⁺	PrtS ⁺
4F44	Fromage	<i>prtS</i> ⁺	PrtS ⁺
PB302	Yaourt	<i>prtS</i> ⁺	PrtS ⁺
PB385	Yaourt	<i>prtS</i> ⁺	PrtS ⁺
CNRZ391	Yaourt	<i>prtS</i> ⁺	PrtS ⁺

Tableau 11. Compositions des milieux de culture utilisés pour la croissance bactérienne.

Milieu	Composition	Utilisation
Lait reconstitué à 10% stérilisé 15 min à 110°C	Lait en poudre écrémé	10 % (m/v)
		Conservation des souches à - 80°C Préculture à 42°C
M17 (Terzaghi et Sandine 1975) stérilisé 20 min à 120°C	Bactotryptone	2,5 g
	Extrait de levure	2,5 g
	Sulfate de magnésium	0,25 g
	Acide ascorbique	0,5 g
	Extrait de viande	3 g
	Soyase	5 g
	Lactose	20 g
	Bactopeptone	2,5 g
Milieu YL (Morice <i>et al.</i> , 1992) additionné d'urée + et de nickel	β-glycérophosphate de Na	19 g
	H ₂ O qsp	1L
	Extrait de levure	8 g
	Lactose	20 g
	Urée	5 g
	Chlorure de Nickel	2 mg
	H ₂ O qsp	1 L

Cultures
Extraction d'ADN et de protéines

Cultures
Récupération de la protéase
soluble après croissance en
milieu YL modifié.

Le lactose est stérilisé séparément pour éviter la réaction de Maillard puis mélangé aux autres constituants.

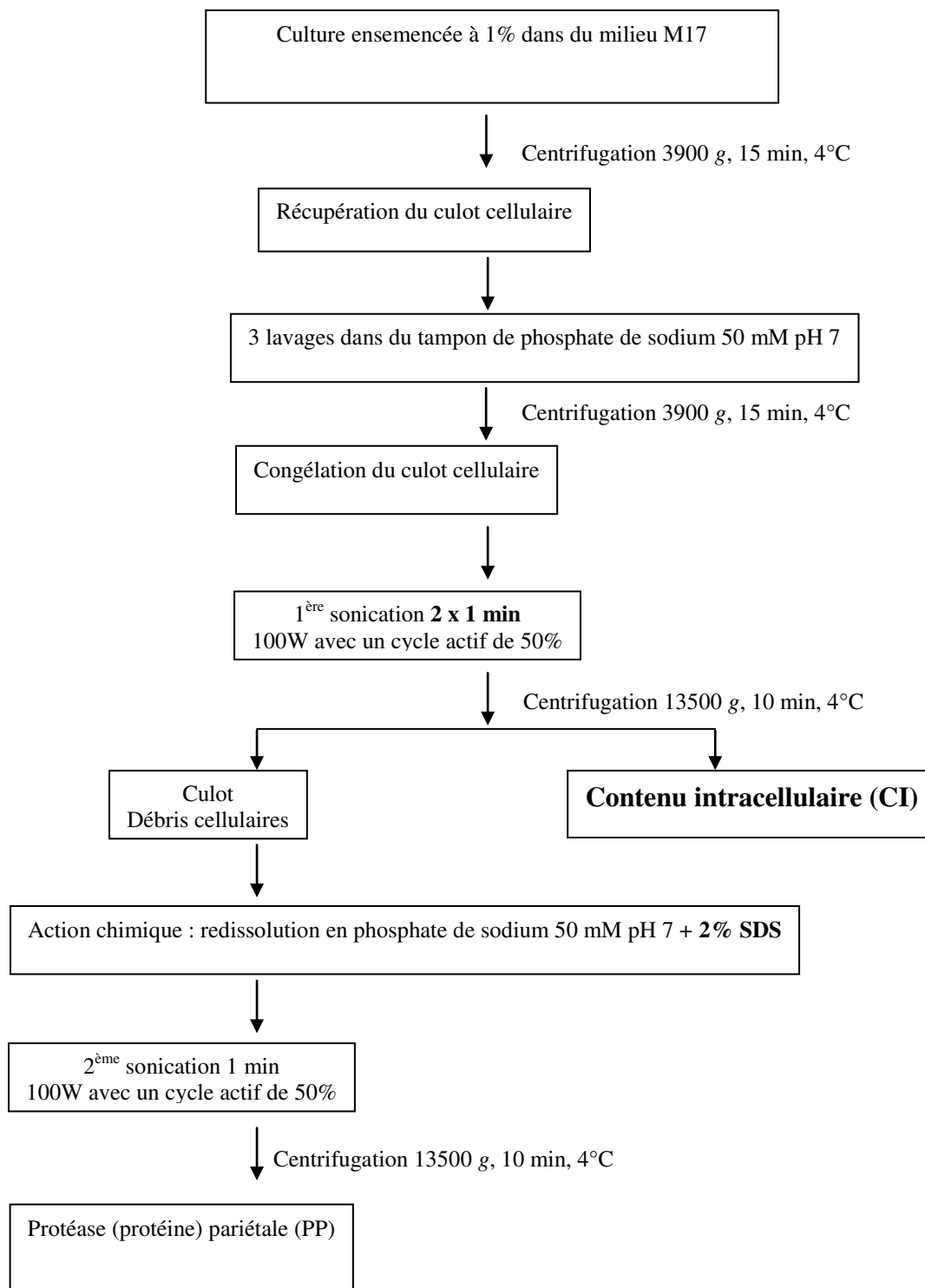


Figure 15. Protocole d'extraction de la fraction protéolytique pariétale de *Streptococcus thermophilus*.

3. Récupération des surnageants de milieux de culture

Les milieux de culture ont été soumis à centrifugation à 3 900 g (15 min - 4°C) afin de récupérer les surnageants, ces derniers ont été filtrés au travers d'un filtre 0,45 µm pour éviter la présence de toute cellule. Ces surnageants de culture ont ensuite été utilisés pour la mise en évidence d'une protéase extracellulaire.

4. Obtention de la fraction enrichie en enzyme PrtS soluble

4.1. Dessalage par chromatographie sur Sephadex G-25.

Des surnageants de milieux de culture des souches 4F44 et PB385 cultivées jusqu'à la fin de la phase exponentielle (5 h) ont été préparés comme précédemment, puis dessalés par passage sur modules de résine (column PD-10 Pharmacia, Uppsala Suède) Sephadex G-25 et concentrés par évaporation sous vide.

4.2. Centrifugation sur module filtrant

D'autres expérimentations ont été menées sur des concentrats obtenus par centrifugation sur des modules Microcon (Millipore, MA, USA) à seuil de coupure indiqué de 50 kDa (Figure 16).

4.3. Enrichissement de la fraction enzymatique sous l'effet du pH

Le pH isoélectrique théorique (en utilisant le logiciel protparam <http://web.expasy.org/protparam/>) de la protéase PrtS entière chez la souche LMD-9 est de 4,38. Celui de la protéase PrtS sans peptide signal (forme non mature) est de 4,34 et de la forme mature (sans peptide signal et sans propeptide) est de 4,48. Nous avons admis l'hypothèse que la protéase PrtS libre de la souche 4F44 est précipitée vers son pH isoélectrique pour en faire une méthode de récupération d'une fraction enrichie en enzyme (Figure 17). Le milieu obtenu après 5 h de culture de la souche 4F44 à 42°C sur milieu M17 et ayant atteint un pH d'environ 4,6 a été soumis à centrifugation (3900 g, 15 min, 4°C). Les culots cellulaires contenant l'enzyme PrtS soluble précipitée, ont été lavés 2 fois dans un tampon acétate pH 4,6 puis suspendus dans du tampon 50 mM Tris-HCl, pH 8,0.

Cette fraction dite enrichie sera utilisée :

- pour déterminer les séquences aminotermiales de la protéine PrtS libre mature et non mature,
- pour mener l'hydrolyse trypsique de PrtS afin d'obtenir les peptides de l'extrémité carboxyterminale
- pour estimer comment PrtS libre hydrolyse la caséine β par rapport à la caséine α_{s1} .

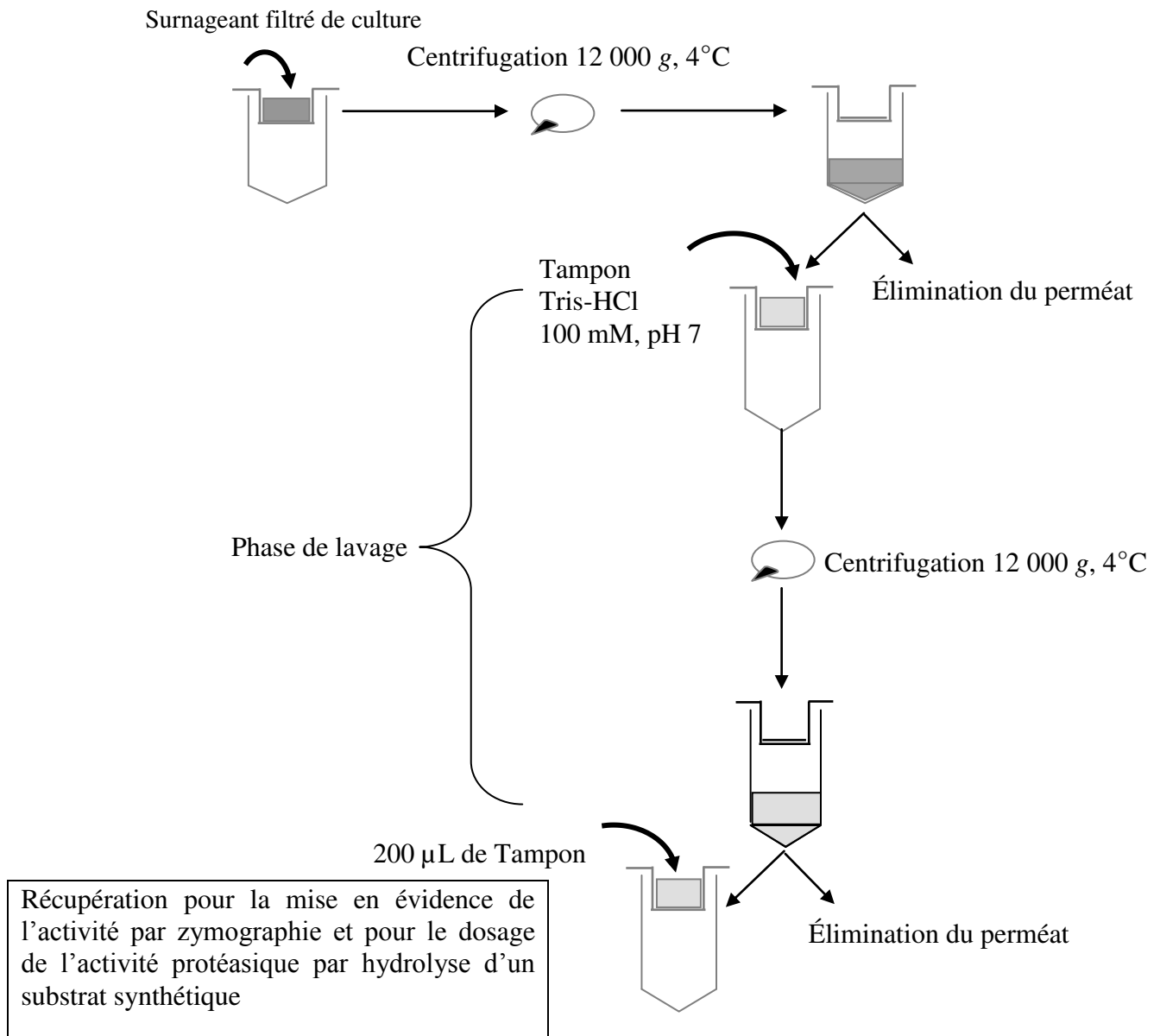


Figure 16. Représentation schématique de la concentration des protéines extracellulaires (dont la protéase) par ultrafiltration au seuil de coupure de 50 kDa (Microcon).

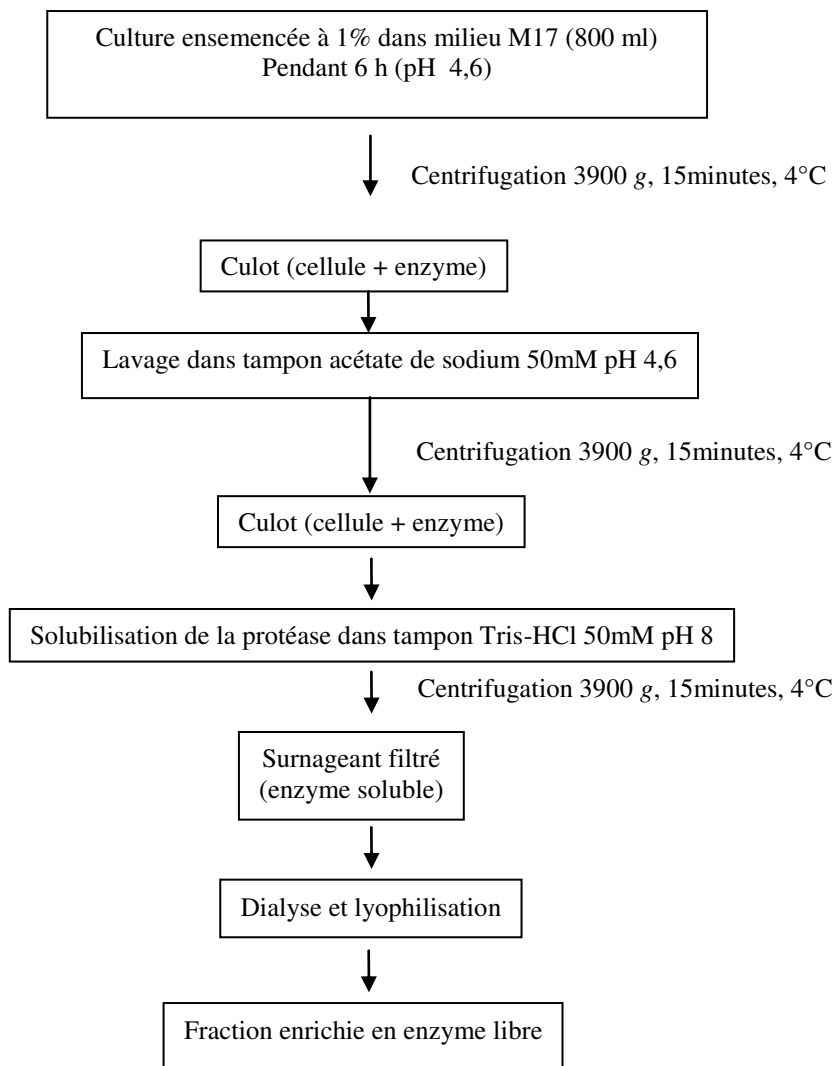


Figure 17. Représentation schématique de l'obtention des fractions enrichies en enzyme PrtS libre utilisées :

- pour déterminer la séquence N-terminale de la protéine PrtS,
- pour caractériser la région C-terminale de la protéine PrtS,
- pour étudier la spécificité de coupure de l'enzyme PrtS sur la caséine β par rapport à la caséine α_{s1} .

Après une nouvelle centrifugation à 3 900 g, 4°C, 15 min et une filtration sur filtre 0,45 µm, le surnageant contenant la fraction enrichie en enzyme PrtS libre a été dialysé et lyophilisé.

Pour récupérer facilement la protéase libre après culture, sans devoir ni dialyser ni lyophiliser, nous avons utilisé le milieu YL supplémenté en nickel et urée (Tableau 11). Ainsi, le milieu obtenu après 16 h à 42°C et ayant atteint un pH d'environ 6 a été soumis à centrifugation à 3 900 g, 15 min, 4°C. Les bactéries en présence d'urée et de nickel sécrètent de l'ammoniaque qui neutralise l'effet de l'acide lactique sécrété par *S. thermophilus*. Le pH en fin de croissance étant bien supérieur au pH isoélectrique de la protéase, PrtS n'était pas précipitée. Les culots cellulaires ont été éliminés et le surnageant filtré (0,45 µm). La protéase soluble a été directement utilisée pour réaliser des hydrolyses de caséine totale.

5. Mise en évidence et mesure de l'activité enzymatique

5.1. Mise en évidence de l'activité protéasique par zymographie

La méthode de zymographie utilisée (Galia *et al.*, 2009 ; Raulo *et al.*, 2002) a permis de détecter une activité protéolytique après électrophorèse en gel de polyacrylamide (T = 7,5%) en présence de SDS renfermant comme substrat de la caséine entière à la concentration finale de 0,025%. Les échantillons ont été dilués volume à volume avec du tampon d'échantillon (sans ajout de 2-mercaptoéthanol) et non chauffés. L'électrophorèse a été réalisée à 500 V, 60 mA et 30 W pour un gel. Après migration, le gel a été placé sous agitation dans une solution de Triton X-100 à 2,7% pendant 90 min à température ambiante, puis incubé pendant 48 h à 37°C dans une solution de Tris 20 mM, pH 7,5 contenant 2,7% de Tween 80, 13,5 mM de CaCl₂ et 50 mM de NaCl. Le gel a été ensuite coloré au bleu de Coomassie R-250 (voir méthodes électrophorétiques ci-dessous) et décoloré jusqu'à détection des plages d'hydrolyse.

5.2. Mise en évidence et mesure de l'activité à l'aide de substrats synthétiques

Un test enzymatique permettant de détecter et mesurer l'activité PrtS a été utilisé. Le substrat (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*NA) a été dissout dans 1 volume de diméthylformamide pour 9 volumes de tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8 contenant 5 mM de CaCl₂. Les échantillons (0,1 mL) dessalés et concentrés ont été testés à 37°C sur 1 mL de solution de substrat. Lors d'une mesure, l'activité enzymatique a été lue au spectrophotomètre à 410 nm. Le même protocole a été utilisé avec le substrat Lys-*p*NA pour détecter et mesurer des activités peptidasiques. Lors d'une quantification, l'activité enzymatique est exprimée en nmol.min⁻¹.mL⁻¹ de paranitroaniline libéré. Les absorbances des témoins de lyses des substrats sont soustraites aux absorbances des essais.

6. Méthodes électrophorétiques des protéines

6.1. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium (PAGE-SDS)

La méthode en tampons discontinus de Laemmli et Favre (1973) a été utilisée avec un système de migration verticale (modèle électrophorétique 2001, Amersham Pharmacia, Uppsala, Suède). Le gel a été constitué d'un gel de concentration (T : 4,9% ; C : 2,7%) en tampon Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8 contenant 0,1% (m/v) de SDS et d'un gel de séparation (T=7,5%, C=2,7%) en tampon Tris-HCl, pH 8,8 contenant 0,1% (m/v) de SDS. Le tampon d'électrode (pH 8,3) est constitué de Tris 50 mM, glycine 384 mM et de 0,1% (m/v) SDS. Les échantillons ont été solubilisés dans un tampon Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8 contenant 2% (m/v) de SDS, 5% (v/v) de 2-mercaptoéthanol, 10% (v/v) de glycérol et 0,1% (m/v) de bleu de bromophénol. Les échantillons ont été chauffés à 100°C pendant 3 min avant d'être déposés. Les marqueurs de masses moléculaires ont été constitués d'un mélange (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) de myosine (200,0 kDa), β -galactosidase (116,2 kDa), phosphorylase β (97,4 kDa), sérum albumine bovine (66,2 kDa), ovalbumine (45,0 kDa), anhydrase carbonique bovine (31,0 kDa). La migration a eu lieu sous 60 mA, 500 V. Puis les protéines dans le gel ont été fixées par une solution d'acide trichloroacétique (TCA) à 12% (m/v). Le gel a été révélé dans un mélange constitué de 0,1% (m/v) de bleu de Coomassie R-250, de 2% (m/v) de TCA et de 50% (v/v) d'éthanol. La décoloration a été effectuée par des lavages successifs dans des bains constitués d'un mélange de 30% (v/v) d'éthanol et de 7,5% (v/v) d'acide acétique.

6.2. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence d'urée (PAGE-Urée)

La méthode utilisée a été adaptée de celle de Ng-Kwai-Hang et Kroeker (1984). Un gel de polyacrylamide (T : 8,2% ; C ; 2,7%) en tampon 75 mM Tris-HCl, pH 8,9 contenant 4 M d'urée, d'épaisseur 1,5 mm, a été coulé dans le système de plaques verticales (18 x 16 cm). Le pH du tampon d'électrode contenant 80 mM de glycine a été ajusté à 8,3 par ajout de Tris. Cette méthode a été appliquée aux caséines et aux hydrolysats : les échantillons ont été solubilisés dans un tampon 75 mM Tris-HCl, pH 8,9 contenant 4 M d'urée, 5% (v/v) de 2-mercaptoéthanol, 10% (v/v) de glycérol et 0,1% (m/v) de bleu de bromophénol. La migration électrophorétique a été effectuée sous des conditions électriques de 60 mA, 30 W, 500V pour un gel à 4°C. La fixation et les phases de coloration et décoloration ont été réalisées comme précédemment.

6.3. Electrophorèse bidimensionnelle

6.3.1. IEF

La méthode d'Herbert *et al.* (1998) a été adaptée. Une partie du lyophilisat contenant la protéase soluble a été solubilisée dans 2 mL d'eau. Un volume de 0,4 mL a été re-lyophilisé et ce lyophilisat a été resuspendu dans 200 μ L d'une solution contenant 8 M d'urée, 4% (m/v) de sulfonate de 3-[(3-cholamidopropyl)-diméthylammonio]-1-propane (CHAPS), 2 mM de tributyl phosphine, 40 mM de Tris, 0,2% (m/v) d'ampholines 3-10 (Bio-Lytes 3-10 ; Bio-Rad) et 0,001% (m/v) de bleu de bromophénol. Des bandelettes ("IPG-strips" de 11 cm) de gel de polyacrylamide (T : 4% ; C : 3%) prêtes à l'emploi ont été utilisées. Des ampholines ont été fixées de manière covalente au polyacrylamide après avoir pré-établi un gradient linéaire de pH. Le gradient de pH utilisé est compris entre 3,0 et 6,0 pour les protéines du milieu (IPG ReadyStrip pH 3-6 ; Bio-Rad). Les "IPG-strips" ont été placés dans l'appareil Protean IEF Cell (Bio-Rad) et réhydratés activement (différence de potentiel constante de 50 V) avec les solutions protéiques correspondantes pendant 15 h à 20°C. L'isoélectrofocalisation a été réalisée en trois étapes (à 20°C). Premièrement, un faible voltage de 250 V a été appliqué pendant 15 min afin d'éliminer les ions salins en excès ; deuxièmement, une montée en gradient du voltage de 250 à 8000 V a été programmée sur 2 h, avec un courant limite de 50 μ A. Troisièmement, le voltage est maintenu constant à 8000 V pendant 5 h. Après migration, les "IPG-strips" ont été conservés à -20°C.

6.3.2. PAGE-SDS pour PAGE-2D

Après l'IEF, les "IPG-strips" ont été équilibrés pendant 15 min dans du tampon Tris-HCl 125 mM, pH 6,8 contenant 6 M d'urée, 2% (m/v) de SDS, 20% (v/v) de glycérol et 5 mM de tributyl phosphine. Chaque "IPG-strip" a été scellé au sommet d'un gel de PAGE-SDS avec de l'agarose à 1% (m/v) fondu dans du tampon d'électrode. La seconde dimension (PAGE-SDS) a été réalisée. Les points isoélectriques (pI) des protéines ont été déterminés à l'aide d'un mélange de protéines standards (2-D PAGE-SDS Standards ; Bio-Rad) contenant de l'inhibiteur trypsique (pI = 4,5), de l'actine (5,1), de l'albumine (5,5), de l'anhydrase carbonique (6,2), de la conalbumine (6,3 et 6,6), de la myoglobine (7,0) et des glycéraldéhyde-3-phosphodéhydrogénases (6,9 et 7,6). Les relations entre les pI apparents et les migrations relatives (R_f) lors de la première dimension ont été linéaires avec l'IPG ReadyStrip pH 3-6 de 11 cm (R_f mesurée à partir du côté le plus acide du gel correspondant à pH 3,0).

6.4. Electrotransfert de protéines

L'électrotransfert de PrtS libre (préparée comme indiqué à la figure 17) a été réalisé par la méthode habituellement utilisée dans notre laboratoire (Matéos, 2008). La membrane PVDF a été incubée pendant 2 secondes dans 100% de méthanol puis lavée 2 min dans de l'eau ultra-pure et équilibrée 10 min dans du tampon de transfert composé de 10 mM d'acide 3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonique (CAPS), pH 11 contenant 10% (v/v) de méthanol. Après migration électrophorétique, le gel de polyacrylamide a été équilibré 15 min dans le tampon de transfert puis mis en contact avec la membrane de PVDF. Des feuilles de papier buvard, préalablement découpées à la taille du gel, ont été trempées dans le tampon de transfert afin qu'elles en soient totalement imbibées (6 feuilles par gel). L'électrotransfert a été réalisé grâce à un appareil de transfert semi-sec (System TE 77 Power, 21 x 26 cm, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Trois feuilles de buvards imbibées de tampon de transfert ont été placées sur l'électrode inférieure anode en évitant les bulles d'air. Ensuite, la membrane PVDF, le gel et les feuilles de papier buvard restantes ont été empilées les unes sur les autres. Le couvercle de l'appareil contenant la cathode a été refermé. Le courant à appliquer est fonction de la surface des gels à transférer ($0,8 \text{ mA.cm}^{-2}$). Le transfert dure 5 à 6 heures. Les protéines transférées sur la membrane PVDF ont été révélées pendant 10 min dans une solution de rouge Ponceau S 0,2% (m/v) et 1% (v/v) d'acide acétique. La décoloration a été réalisée dans l'eau. Puis la membrane a été séchée à l'air libre.

7. Microséquençage protéique N-terminal selon Edman

Le micro-séquençage N-terminal a été réalisé sur des spots découpés dans la membrane de PVDF par dégradation d'Edman au Service Commun de Séquences de Protéines de l'Université (Microsequencer modèle 476A, Applied Biosystems, Foster city, CA, USA).

8. Hydrolyse des caséines par PrtS libre

Le lait cru provient de la ferme expérimentale de la Bouzule (Champenois, France). Le lait a été écrémé par centrifugation à 4000 g (20 min, 4°C). La caséine entière (caséinate de sodium), les caséines β , α_{s1} ont été utilisées après préparation par chromatographie en batch (DEAE-cellulose DE 23) dans notre laboratoire (Tauzin *et al.*, 2002 ; Sanogo *et al.*, 1989).

Le mélange 1/1 des caséines β et α_{s1} à 0,1% ont été solubilisées dans un tampon d'hydrolyse contenant 50 mM de phosphate de potassium, pH 7,5 et 0,02% (m/v) d'azote de sodium. Une fraction aliquote de 15 mg (Figure 17) contenant la protéase PrtS libre a été dissoute dans 3 mL d'eau. Cette fraction aliquote d'enzyme a été ajoutée à 10 mL de solution de caséine à 0,1% puis incubée à 37°C (0 h, 2 h, 4 h, 24 h et 48 h). Aux temps donnés, 2 mL du milieu réactionnel ont été prélevés et

immédiatement chauffés à 100°C durant 5 min afin d'arrêter l'activité de l'enzyme. Ils ont été ensuite filtrés et répartis en fractions aliquotes avant utilisation. L'hydrolyse de chaque caséine a été vérifiée par PAGE-urée et par RP-HPLC.

Après croissance de *S. thermophilus* 4F44 dans le milieu de culture YL, la protéase soluble est récupérée dans le surnageant, après avoir éliminé les bactéries par centrifugation et filtration. Le surnageant contenant la protéase a été utilisé pour suivre la protéolyse de la caséine entière. La caséine utilisée à 0,2% ou 0,02% a été solubilisée dans un tampon d'hydrolyse 100 mM de Tris-HCl pour pH 7, MES-NaOH pH 6 contenant CaCl₂ à 5 mM comme co-effecteur de PrtS.

Un même volume de surnageant filtré contenant la protéase PrtS a été ajouté dans 20 mL de solution de caséine (concentration finale 0,1% pour pH final 7 et 6 ; 0,01% pour pH 7) puis incubé à 37°C pendant 1 h, 4 h et 22 h. Aux temps donnés, un volume de 10 mL du milieu réactionnel a été prélevé et immédiatement du TFA a été ajouté (jusqu'à atteindre une valeur de pH égale à 2) afin d'arrêter l'activité de l'enzyme. Ils ont été ensuite filtrés, répartis en fractions de 1 mL et lyophilisés. L'hydrolyse de la caséine entière a été vérifiée par RP-HPLC pour chaque condition (pH et temps).

9. Chromatographie liquide haute performance en phase inversée (RP-HPLC) sur colonne C18 analytique

L'étude des hydrolysats a été réalisée sur une colonne Stability C₁₈ (150 x 2 mm, Ø 5 µm, porosité 100 Å, CIL Cluzeau Info Labo) reliée au système HPLC Alliance 2690 (Waters, Milford, MA, USA). Les échantillons (correspondant à 100 µL lyophilisés) ont été dissous dans 1 mL de mélange contenant 95% de solution A (0,1% TFA + 0,1% ACN dans l'eau ultra-pure) et 5% de solution B (0,1% TFA dans ACN). Le débit était de 250 µL.min⁻¹ et le volume d'échantillon injecté sur la colonne était de 400 µL. Un gradient linéaire de 5 à 50% d'ACN en présence de 0,1% (v/v) de TFA a été appliqué pendant 90 min. Les échantillons (correspondant à 700 µL de lyophilisat) ont été injectés, afin de collecter les pics pour l'analyse en spectrométrie de masse.

Pour les hydrolysats obtenus à partir de caséine entière en utilisant le surnageant de culture en milieu YL, un volume de 400 µL (correspond à 1 mL de milieu réactionnel lyophilisé) a été injecté sur la colonne. Une élution en mode isocratique (5% d'ACN en présence de 0,1% (v/v) de TFA) a été appliquée pendant 10 min précédant un gradient linéaire de 5 à 50% d'ACN a été réalisé pendant 90 min. Ces échantillons ont également été analysés par spectrométrie de masse.

10. Analyse par spectrométrie de masse des protéines et des peptides

10.1. Analyse des hydrolysats de caséine

Pour l'étude de la spécificité de coupure de PrtS libre sur les caséines, les peptides générés ont été analysés en spectrométrie de masse au Laboratoire de Sciences et Technologie du Lait et de l'Œuf (STLO, INRA de Rennes).

Les échantillons collectés ont été repris dans un volume final de 100 μL de TFA 0,1%. Deux dilutions au 1/100 et 1/25 ont été effectuées avant injection en nanoLC-ESI-MS-MS. Des volumes de 5 μL de chacune des dilutions ont été injectés dans un système nano HPLC system Dionex/LC Packings (Dionex corporation, Nederland) comprenant une phase de concentration de l'échantillon sur cartouche RP HPLC C_{18} PepMap 100 (Dionex corporation, Nederland), 5 μm , 100 \AA (300 μm i.d. \times 5mm), suivie du gradient primaire d'élution avec un diviseur de flux appliqué permettant une séparation à 300 $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$ sur une colonne de séparation PepMap C_{18} (Dionex corporation, Nederland), 3 μm , 100 \AA (75 μm i.d. \times 150 mm). Les tampons utilisés étaient : tampon A (eau + 2% ACN + 0,08% HCOOH + 0,01% de TFA) et tampon B (eau + 95% ACN + 0,08% HCOOH + 0,01% de TFA). Une étape isocratique à 10% (v/v) de tampon B a été appliquée pendant 10 min puis un gradient linéaire de 10 à 40% de tampon B a été appliqué pendant 50 min. Le débit était de 0,3 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

Les peptides séparés ont été ionisés dans la source "micro-spray" (API III⁺, MDS SCIEX, Toronto, Canada) avec une tension optimisée aux environs de 3500 V.

L'obtention de spectres de masses MS et MS/MS des différents peptides a été obtenue grâce à une procédure IDA (Intelligent Data Acquisition) : cycle (de 10 s) permettant la mesure séquentielle d'une MS (Survey Scan) suivie de 3 MS/MS sur un appareil de type Q-TOF : Q STAR XL MS/MS System (MDS Sciex, Toronto, Canada) (Pour la MS/MS : sélection des ions 1⁺ à 4⁺ dans une gamme de m/z allant de 400 à 2000).

La calibration du spectromètre a été effectuée avec le peptide f (193-209) de la caséine β .

L'analyse a été interprétée et validée à l'aide des moteurs de recherches automatiques MASCOT v2.2. La recherche a été faite en intégrant 3 modifications possibles (oxydation de la méthionine ; désamidation de la glutamine et/ou de l'asparagine ; phosphorylation de la serine et/ou thréonine) ainsi qu'aucune coupure enzymatique spécifique. La tolérance de masse en MS est de 0,2 Da et la tolérance des fragments en MS/MS est de 0,2 Da.

10.2. Analyse de la protéine PrtS par la technique du "Bottom-Up"

Après une PAGE-SDS, les bandes ont été découpées et stockées dans de l'acide acétique 1%. L'hydrolyse trypsique et les analyses de spectrométrie de masse ont été réalisées par la plateforme de Spectrométrie de Masse Biologique et Protéomique (SMBP), USR 3149 ESPCI, Paris-Tech. Les bandes de gel PAGE-SDS ont été réhydratées avec une solution de NH_4CO_3 25 mM, CaCl_2 5 mM et de trypsine (6,25 ng/ μL) pendant 1 h 30, après réduction au DTT 10 mM et alkylation avec l'iodoacétamide 5 mM. Après élimination de l'excès de solution, du tampon $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 25 mM a été ajouté pour une digestion pendant la nuit. La digestion a été arrêtée par ajout de 30 μL d'acide formique à 50% pour limiter le volume de solution. Ensuite une extraction des peptides a été réalisée, la solution a été concentrée. L'extraction des peptides du gel et le dessalage ont été réalisés sur ZIP-TIP (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France).

10.2.1. MALDI-TOF des peptides tryptiques de PrtS

L'analyse des peptides tryptiques de PrtS a été réalisée en MALDI-TOF-TOF/MS (Tandem 4800 MALDI TOF/TOFTM Analyzer, Applied Biosystems Inc., Framingham, MA, USA). L'acquisition des données a été réalisée de façon automatique pour le mode MS, après réglage des paramètres en mode manuel. Les analyses MS ont été réalisées en mode positif avec réflectron (1200 pulses laser-intensité 2800) sur une gamme de masse de 600 Da à 4000 Da.

La plaque a été calibrée en externe (13 positions réparties sur la plaque) à l'aide d'un mélange peptidique standard (Proteomix Peptide mix4, LaserBioLabs, Sophia Antipolis, France), composé des peptides suivants : fragment 1-5 de la bradykinine (MW=573,3150), Angiotensine II humaine (MW=1046,5424), Neurotensine (MW=1672,9176), fragment 18-39 de l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) (MW=2464,1989) et chaîne β de l'insuline (MW=3494,6514). La calibration des spectres est ensuite affinée, par calibration interne sur des peptides de masse connue issus de l'autolyse de la trypsine.

L'analyse a été interprétée et validée à l'aide des moteurs de recherches automatiques MASCOT (Perkins *et al.*, 1999). La recherche a été réalisée en intégrant 2 modifications possibles (carbamidométhylation et oxydation des méthionines). Le nombre de mauvaises coupures (miscleavage) possibles est de 2. La tolérance de masse en MS est de 50 ppm et la tolérance des fragments en MS/MS est de 0,1 Da.

10.2.2. ESI-FT-ICR MS/MS des peptides tryptiques de PrtS

10.2.2.1. Condition de séparation en nano LC

Les séparations ont été réalisées sur une chaîne de nanoHPLC U3000 (Dionex corporation, Netherlands).

L'échantillon brut (8 μ L injectés) a été dessalé et concentré en ligne par une précolonne (PepMap100 Å, 3 μ m, 300 μ m d.i., longueur 5 mm, Dionex corporation, Netherlands) avant d'être élué et séparé sur une colonne analytique à polarité de phase inversée (PepMap100 Å, 3 μ m, 100 Å, 75 μ m d.i., longueur 15 cm, Dionex) avec un débit de 220 nL.min⁻¹. Le profil du gradient linéaire était : 99% de solution A (98% d'eau, 2% d'acétonitrile et 0,1% d'acide formique) et 1% de solution B (10% d'eau, 90% d'acétonitrile et 0,1% acide formique) pendant 5 min pour le dessalage à 15 μ L.min⁻¹ puis 5% de solution B pendant 3 min à 300 nL.min⁻¹, 5% à 25% de solution B en 32 min, montée à 90% de solution B en 1 min et palier à 90% de solution B pendant 10 min.

10.2.2.2. Analyse en spectrométrie de masse

Les analyses ont été réalisées sur un appareil à très haute résolution de type nano ESI FT-ICR (LTQ, Thermofisher, San Jose, CA, USA). Les acquisitions se font en mode automatique dynamique : alternance de cycles comprenant une acquisition en mode FTMS full scan survey (m/z 400-2000Th), et 7 LIT (linéaire) MS/MS mode pour le séquençage à haute sensibilité.

L'analyse a été interprétée et validée à l'aide des moteurs de recherches automatiques MASCOT (Perkins *et al.*, 1999). La recherche a été réalisée en intégrant 6 modifications possibles (carbamidométhylation de cystéine, oxydation de la méthionine, désamidation de la glutamine et/ou de l'asparagine, formylation du résidu d'acide aminé en position N-terminale, phosphorylation de la sérine et/ou thréonine et éthylation du résidu d'acide aminé en position N-terminale). Le nombre de mauvaises coupures (miscleavage) possibles est de 2. La tolérance en MS est de 10 ppm et la tolérance des fragments en MS/MS est de 0,1 Da.

11. Analyse de séquences des gènes *prtS* et *srtA*

11.1. Extraction d'ADN et séparation des fragments de restriction

La souche de *S. thermophilus* a été cultivée pendant 24 h à 42°C dans 50 mL de milieu M17. L'extraction d'ADN a été effectuée selon Fischer *et al.* (1997). Les fragments de restriction d'ADN ont été séparés selon la méthode décrite par Sambrook *et al.* (1989). Des marqueurs de taille d'ADN (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) de 1 kb et 100 pb ont été utilisés.

11.2. PCR (Réaction en Chaîne par la Polymérase) et séquençage d'ADN

11.2.1. Amplification par PCR

Les gènes *prtS* et *srtA* (sortase A) ont été amplifiés par PCR selon la méthode de Galia *et al.* (2009). Les différents couples d'amorces utilisés dans notre étude sont présentés dans le tableau 12.

Tableau 12. Séquences des amorces utilisées pour l'amplification par PCR.

Amorces	Séquences (5'→3')	Séquence ciblée (nucléotides)
Gène codant la protéase PrtS		
Prt For	TACGGTGAATGGTTTAACG	628
Prt Rev	AATTACTTTACTACCAACCG	1159
Style 1	CCAACAACAAGGCACTCATT	(-) 267
Style 2	GTTGAGTTGTTTCTACTTCTGT	322
Style 3	ACTAAGGTGGAAGCAACTGTT	129
Style 4	ATTGTCCAGCGACTGGTTGT	775
Style 5	CAGCTGGTAATGATGGAACAT	101
Style 6	CCAACCTGAAAAATCTGAAAGAA	1599
Style 7	CAATCCATCTGTCTTCATTC	1465
Style 8	CCGTTGTTAATTGTGTTGAGT	2056
Style 9	GTTTATATTTGACTGGCGAAG	1918
Style 10	GTCTTGATCGCAGAGTCAG	2492
Style 11	GAACCTGTTACAGCACAGC	2374
Style 12	GCTGGACGAGGGTTAAATG	2966
Style 13	GTTCCAGGTGCAGCAGTACA	1851
Style 14	ACCAAATGGTAGCTTAAGAACG	3387
Style 15	TCAGTCACCGATGAAACAGG	3304
Style 16	ATAGGCAGTTTGAAGTTCTGG	3858
Style 17	ACTTGCAAACCAGTCAAATGTTA	3723
Style 18	CGCTGCTTCAACTGCCTGG	4311
Style 19	GCAGCGAAAGCCAACCTAGA	4491
Style 20	TTCCTTGTGACGTCGTATGC	4749
Style 1-1	ACAAATTCATGCCGTTTATAAG	(-) 864
Style 1-2	TTGTCGGCATCGCAAGTATAT	(-) 65
Style 20-1	ATTCAGAGCATGTACCGATAG	4636
Style 20-2	TGATCTGAGAACATAAGGGTC	5282
Gène codant la Sortase A		
For1	CCCAGATGGGTTCTCAAAAA	265
Rev1	CGGACGGTGATTTTCACGTA	911
For2	TCAAGGGGTTAAGGTCATGC	(-) 114
Rev2	TATCAGAAGCCCCAGCGATA	468

Chaque PCR a été effectuée dans l'appareil « My Cycler » (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Dans le cas du gène *prtS* de la souche 4F44, l'amplification a été effectuée dans un volume final de 50 µL contenant 1,25 U de polymérase Taq d'ADN (Sigma, St Louis, MO, USA), 200 ng d'ADN génomique, 200 µM de chaque dNTP et 25 µM de chaque couple d'amorces. Les conditions d'amplification par PCR sont présentées dans le tableau 13.

Tableau 13. Programmes appliqués pour l'amplification du gène *prtS*.

	Paramètres	Objectif
Première étape	94°C, 4 minutes	Séparation des brins d'ADN
Deuxième étape (répétée 30 fois)	94°C, 30 secondes	Dénaturation
	58°C, 30 secondes	Hybridation des amorces sur l'ADN
	72°C, 30 secondes	Réaction d'élongation
Troisième étape	72°C, 10 minutes	Réaction d'élongation

Pour le gène de *srtA*, l'amplification a été effectuée dans un volume final de 20 µL contenant 1,25 U de polymérase Taq d'ADN (Sigma, St Louis, MO, USA), 200 ng d'ADN génomique, 200 µM de chaque dNTP et 0,5 µM de chaque couple d'amorce pour les souches 4F44, PB18O, CNRZ302, LMD-9 et CNRZ307. Les conditions d'amplification par PCR sont présentées dans le tableau 14.

Tableau 14. Programmes appliqués pour l'amplification du gène *srtA*.

	Paramètres	Objectif
Première étape	94°C, 3 minutes	Séparation des brins d'ADN
Deuxième étape (répétée 30 fois)	94°C, 45 secondes	Dénaturation
	55°C, 30 secondes	Hybridation des amorces sur l'ADN
	72°C, 45 secondes	Réaction d'élongation
Troisième étape	72°C, 10 minutes	Réaction d'élongation

11.2.1. Séquençage des produits amplifiés

Les séquençages des fragments des ADN génomiques amplifiés par PCR ont été effectués par la société Cogenics (Meylan, France). Les séquences nucléotidiques obtenues et les séquences protéiques déduites ont été analysées par le logiciel « NCBI blast » (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La comparaison de séquence et l'alignement ont été réalisés

à l'aide du logiciel « Bioedit » (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>) en utilisant l'algorithme « Clustal W ».

11.2.2. Séparation des amplicons par électrophorèse en gel d'agarose

Les produits obtenus par PCR ont été déposés pour une électrophorèse sur un gel d'agarose permettant de séparer l'ADN en fonction de la taille : sous l'effet du champ électrique les acides nucléiques chargés négativement grâce à leurs groupes phosphate se déplacent ainsi vers la borne positive, à des vitesses différentes selon leur taille.

Les fragments amplifiés sont des fragments d'environ 500 pb pour le gène de *priS* et de 583 pb et 647 pb pour le gène de sortase SrtA. Des gels de concentration à 2% d'agarose ont été utilisés : 0,8 g d'agarose ont été dissous dans 40 mL de tampon de TAE (242 g de Tris, 57,1 mL d'acide acétique et 100 mL d'EDTA 0,5 M, pH 8 dans 1 L d'eau). Après chauffage pour dissoudre l'agarose, 4 µL de SYBR® Safe 10000 X ont été ajoutés. Ce composé s'intercale dans l'ADN et devient fluorescent à l'exposition aux rayons ultraviolets. La solution d'agarose a été coulée dans un moule. Après solidification du gel, il est placé dans une cuve recouverte de tampon TAE 0,5 X. Enfin, les échantillons et 5 µL d'un marqueur ont été déposés dans les puits. Le marqueur de taille utilisé est un mélange EZ-Load 100 pb (détection 100 pb à 1 kb, Biorad) et les échantillons ont été composés de 5 µL des produits de PCR et 1 µL de tampon de dépôt (25 mg bleu de bromophénol, 7 g saccharose, 2 mL EDTA 1 M, pH 8). La migration s'est faite à 100 V pendant environ 45 min. Puis le gel a été directement observé sur la table UV et il a été photographié avec l'appareil Geldoc (Biorad).

Résultats

Partie I

Identification et caractérisation d'une enzyme protéolytique libre dans le milieu de culture de *Streptococcus thermophilus*

1. Mise en évidence d'une activité protéolytique libre chez la souche 4F44.

Pour croître dans le lait, *S. thermophilus* assimile les acides aminés et les oligopeptides contenus dans le lait ou issus de l'hydrolyse des protéines du lait, notamment des caséines. Seule la protéase extracellulaire PrtS a été caractérisée à ce jour chez cette espèce. Cette enzyme est un composant majeur du système protéolytique et est ancrée à la paroi ; elle est présente chez certaines souches. Nous avons voulu recenser s'il existait des types d'activités protéolytiques extracellulaires libérées dans le milieu de culture.

Ainsi, cette recherche a été réalisée sur les 30 souches de *S. thermophilus* réparties en trois groupes (fort, moyen, faible) sur la base de leurs capacités acidifiantes. Les 12 souches ayant de fortes capacités acidifiantes possèdent toutes le gène *prtS* et semblent exprimer fortement l'activité protéolytique de surface PrtS (estimation par zymographie). Les deux souches possédant un faible pouvoir acidifiant sont dépourvues du gène *prtS*, et présentent de faibles capacités protéolytiques. Enfin, parmi les 16 souches possédant des capacités acidifiantes intermédiaires, 5 souches ne possèdent pas le gène *prtS* et 11 le possèdent mais l'expriment peu (3 des 11 souches) ou pas (Tableau 10, Galia et al., 2009).

1.1. Recherche d'une activité protéolytique libre chez la souche PB385

Afin de déterminer s'il existait une activité protéolytique libre dans les milieux de culture, les premiers essais ont été réalisés en utilisant la souche PB385 comme témoin. Après élimination des bactéries par deux étapes de centrifugation de 15 minutes à 3 900 g, le surnageant récupéré a été testé par zymographie. Cette méthode a mis en évidence une faible activité protéolytique dans le milieu de culture (après 4 h de croissance) de la souche *S. thermophilus* PB385. Cette activité pouvait résulter soit de la présence résiduelle de bactéries entières ou lysées soit d'une ou plusieurs protéases libres dans le surnageant. Nous avons complété l'élimination des bactéries en ajoutant une étape de filtration (0,45 µm). Après cette étape nécessaire, aucune activité protéolytique de surface n'a été détectée par zymographie (Figure 18).

1.2. Recherche d'une activité protéolytique libre chez les 30 souches de la collection du laboratoire

Les 30 souches ont été cultivées en milieu M17 pendant 5 h à 42°C, les cellules ont été éliminées par centrifugation et filtration (0,45 µm) afin de récupérer des surnageants de culture.

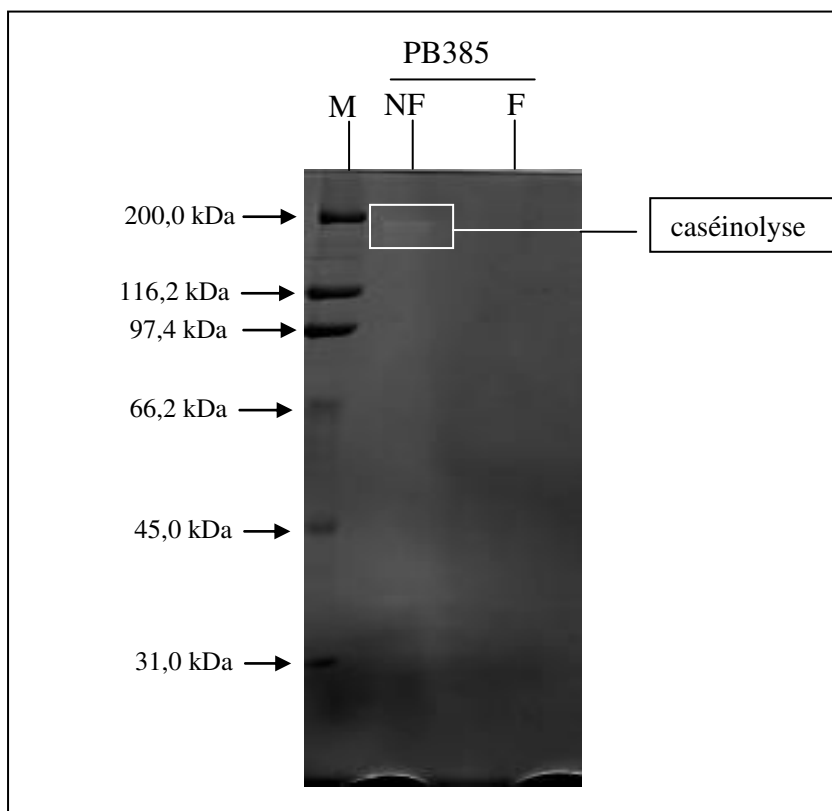


Figure 18. Recherche d'activité protéolytique dans le surnageant de culture centrifugé (2 x 3900 g pendant 15 min) puis filtré (F) ou non filtré (NF) de la souche de *Streptococcus thermophilus* PB385 cultivée en milieu M17 pendant 4 h à 42°C.

Pour la révélation de l'activité, le zymogramme a été réalisé par incubation du gel à 37°C pendant 48 h.

M : myosine (200,0 kDa), β -galactosidase (116,2 kDa), phosphorylase b (97,4 kDa), sérum albumine bovine (66,2 kDa), ovalbumine (45,0 kDa)

Parmi les 30 souches testées, seule la souche 4F44 présente une activité protéolytique extracellulaire libre révélée par zymographie. Les masses moléculaires apparentes estimées sont inférieures à 200 kDa (proche de 154 à 170 kDa pour les deux bandes) (Figure 19). Chez cette souche, l'activité caséinolytique a également été recherchée au niveau de la fonction pariétale et comparée à celle retrouvée chez la souche PB385, utilisée comme témoin.

Une activité protéolytique a ainsi été retrouvée dans les surnageants de culture filtrés (SC F) ou non (SC N), mais aussi au sein des protéines de paroi (PP) extraites avec du SDS après sonication et dans le contenu intracellulaire (CI). Cette protéase libre présente des mobilités relatives similaires à celle de la protéase de paroi de la souche 4F44 mais aussi à celle de la souche PB385 (Figure 20).

Cette activité protéolytique libre n'a jamais été rapportée dans la littérature pour *S. thermophilus*.

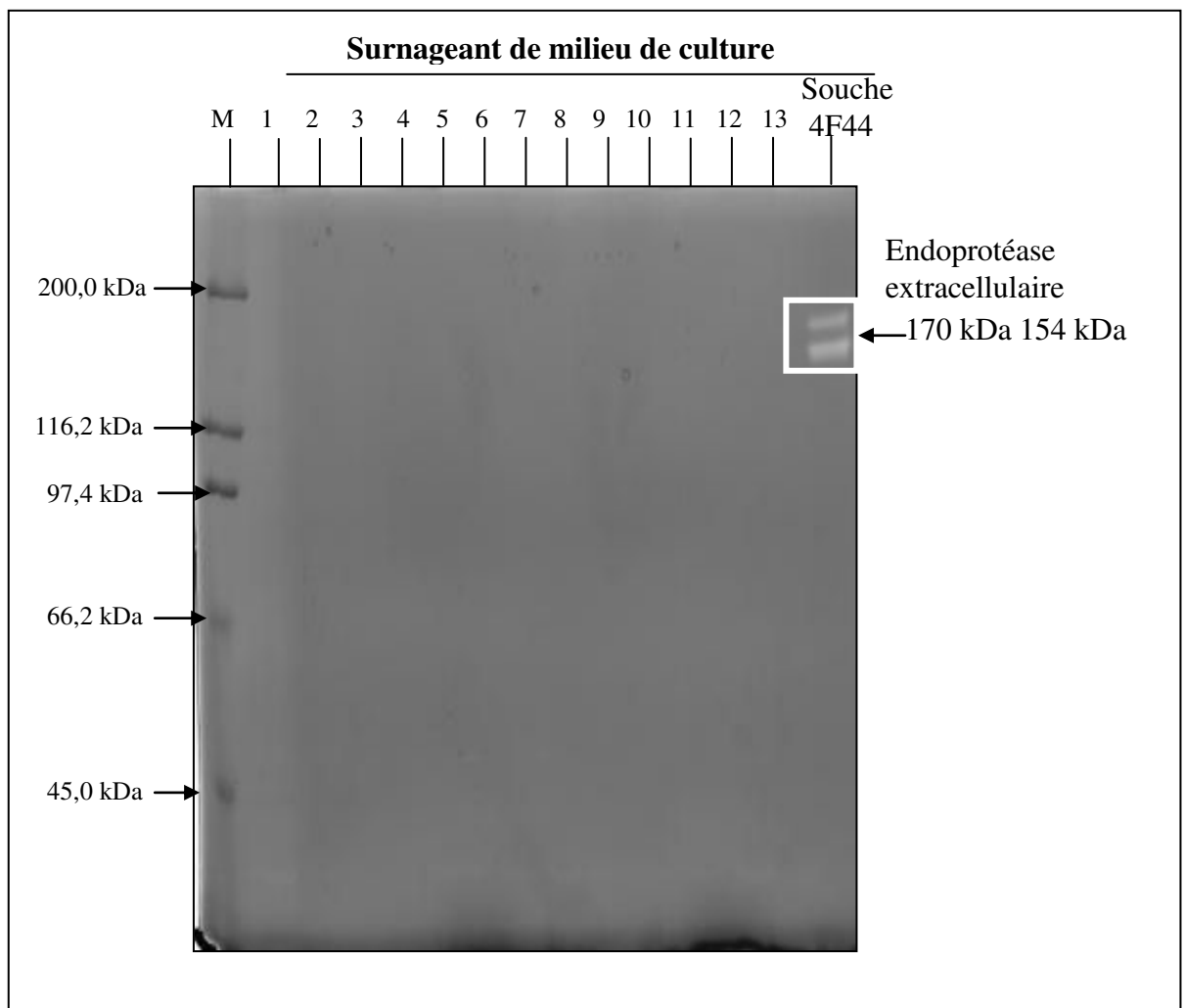


Figure 19. Recherche par zymographie d'une activité caséinolytique extracellulaire dans les surnageants de milieu de culture de souches de *Streptococcus thermophilus*.

1 : PB180, 2 : ATE11PB6, 3 : CNRZ160, 4 : PB302, 5 : CNRZ391, 6 : CNRZ21, 7 : PB385, 8 : ATCC19258, 9 : LMD-9, 10 : CNRE1066, 11 : CNRZ308, 12 : ATE19PB8, 13 : CNRZ455

Les surnageants sont récupérés après centrifugation à 3 900 g (15 min à 4°C) puis filtrés (0,45 µm). Toutes les souches ont été cultivées en milieu M17 pendant 5 h à 42°C. Pour la révélation de l'activité, le zymogramme a été réalisé par incubation du gel à 37°C pendant 48 h.

M : myosine (200,0 kDa), β-galactosidase (116,2 kDa), phosphorylase b (97,4 kDa), sérum albumine bovine (66,2 kDa), ovalbumine (45,0 kDa)

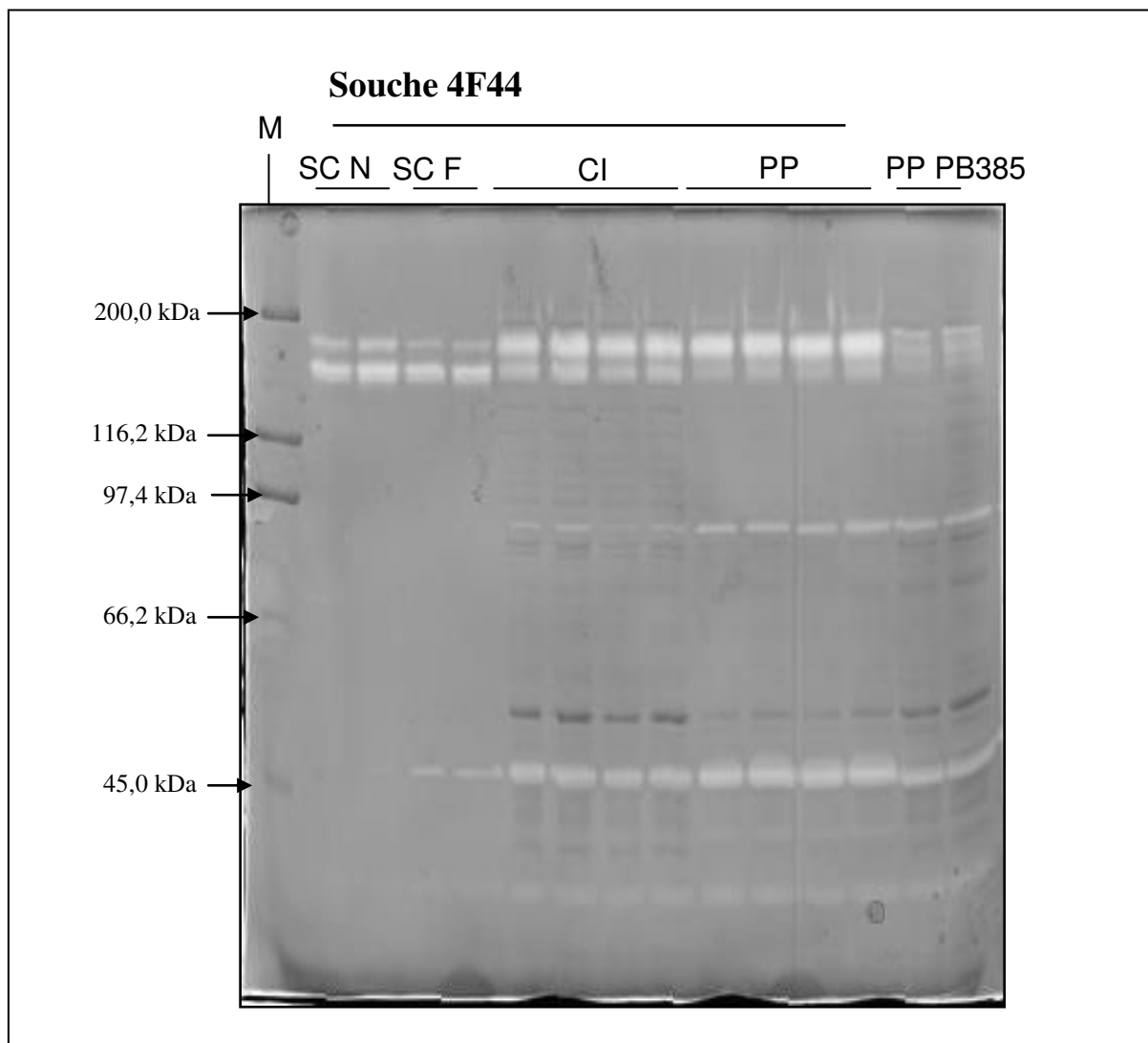


Figure 20. Mise en évidence par zymographie des activités caséinolytiques présentes dans le milieu de culture centrifugé à 3900 g pendant 15 min, filtré ou non (0,45 µm), dans les contenus intracellulaires et dans la fraction enzymatique pariétale de *Streptococcus thermophilus* 4F44.

La culture est suivie en milieu M17 pendant 5 h à 42°C.

SC N : surnageant de culture non filtré, SC F : surnageant de culture filtré, CI : contenu intracellulaire, PP : protéines pariétales.

Référence : fraction enzymatique pariétale PrtS de la souche PB385.

Pour la révélation de l'activité, le zymogramme a été réalisé par incubation du gel à 37°C pendant 48 h.

M : myosine (200,0 kDa), β-galactosidase (116,2 kDa), phosphorylase b (97,4 kDa), sérum albumine bovine (66,2 kDa), ovalbumine (45,0 kDa)

2. Evaluation des activités enzymatiques sur substrats synthétiques

2.1. Recherche des activités enzymatiques sur substrats synthétiques dans les milieux intra- et extra-cellulaires de différentes souches de *S.*

thermophilus

Afin de s'assurer que l'activité protéolytique détectée dans le milieu extracellulaire ne provenait pas de la libération de protéases par lyse des cellules, des substrats synthétiques spécifiques nitroanilidés (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*NA et Lys-*p*NA) ont été utilisés afin de localiser les enzymes dans le surnageant du milieu de culture ou en surface des bactéries, activité protéolytique du type PrtS et/ou activité peptidasique. Cette dernière activité pouvant résulter de différentes peptidases intracellulaires en cas de lyse bactérienne. Ces activités ont été recherchées chez trois souches (4F44, PB385 et LMD-9) soit avec la suspension bactérienne (bactéries sans milieu), soit sur le surnageant de milieu de culture filtré ou sur le contenu intra-cellulaire obtenu après sonication. Avec le substrat Lys-*p*NA, une activité peptidasique a été détectée avec les suspensions bactériennes et les contenus intracellulaires ainsi qu'une activité endoprotéase avec le substrat Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*NA. Aucune activité peptidasique n'a été détectée avec les surnageants filtrés (0,45 µm) des trois milieux de culture ensemencés avec le substrat Lys-*p*NA, traduisant ainsi une absence de lyse cellulaire. Seul le milieu extracellulaire de la souche 4F44 montre une activité endoprotéasique importante sur le substrat Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*NA. Ainsi cette activité enzymatique spécifique indique bien la présence d'une protéase dans le milieu en absence de lyse cellulaire pour la souche 4F44.

2.2 Absence de libération de la protéase

De nombreuses bactéries lactiques possèdent des protéines de surface qui sont, au cours du temps et dans certaines conditions, libérées par activité auto-protéolytique. Afin de vérifier si la protéase ancrée est libérée au cours du temps, les bactéries (4F44, PB385 et LMD-9) récupérées en phase exponentielle de croissance ont été resuspendue à une densité cellulaire donnée (D.O. $_{650\text{ nm}} = 1$) et incubées à 37°C dans un tampon (en présence ou pas de calcium) pendant 1,5 h. Après élimination des bactéries, le substrat chromogène a été ajouté au surnageant. Le mélange a été ré-incubé 1,5 h à 37°C et aucune activité n'a été détectée (ni protéasique, ni peptidasique) chez les trois souches. Ainsi, la protéase PrtS ancrée au peptidoglycane de la paroi bactérienne n'est pas libérée. De plus, aucune activité peptidasique n'a été détectée dans le surnageant, il y a donc absence de lyse dans les conditions d'incubation testées.

2.3. Suivi de l'activité protéolytique libre au cours de la croissance de la souche 4F44

Afin de caractériser la protéase libre, nous avons recherché les conditions optimales de son expression au cours de la croissance de la souche 4F44. Pour cela, une culture de 4F44 en milieu M17 a été suivie sur une durée de 6,5 h. Dans ces conditions, le temps de génération obtenu était de 45 min. L'activité enzymatique du milieu de culture sur le substrat synthétique Suc-Ala-ala-Pro-Phe-pNA a été rapportée en parallèle de la croissance bactérienne et de l'évolution de l'acidification du milieu (Figure 21).

Il a ainsi été observé que l'activité protéolytique est légèrement détectable dans le milieu de culture après 1,5 h, puis augmente de manière importante en phase exponentielle de croissance entre 2 h et 3,5 h (maximum d'activité 27 nmol pna libéré/mL/min) de croissance, le pH descendant jusqu'à une valeur de 5,75. Dès la fin de phase exponentielle, à 4 h de croissance, l'activité chute brutalement pour n'être plus qu'à 35% environ de la valeur maximale, le pH atteint est alors de 5,15. En phase stationnaire de croissance, soit au-delà de 4,5 heures de croissance, le pH va se stabiliser vers 4,5, tandis que l'activité enzymatique va continuer à chuter. Sous l'effet de l'acidification du milieu de culture lors de la croissance de *S. thermophilus* (sécrétion de L-lactate), la protéase pourrait précipiter à l'approche de la valeur de son point isoélectrique.

Pour comprendre la cause de cette perte d'activité lors de la croissance, une deuxième expérimentation a donc été mise en place. Le milieu de culture après 6 heures de croissance a été neutralisé à pH 7,0 par addition de soude avant la centrifugation. Il a été ensuite centrifugé pour éliminer les bactéries, ultrafiltré sur Microcon (50 kDa) et le culot cellulaire a été lavé 2 fois par le même tampon Tris-HCl 100 mM à pH 7. Avec le substrat synthétique, 8 fois plus d'activité a été retrouvée sur le surnageant neutralisé au préalable, démontrant ainsi qu'une quantité importante de protéase libre est perdue dans le culot de centrifugation du milieu de culture resté à pH 4,5. Cette différence d'activité protéolytique est également visualisée par zymographie. Le volume de surnageant déposé est le même dans les deux cas, le surnageant après centrifugation et filtration présente moins d'activité (caséinolyse moins importante) que le surnageant récupéré après remontée du pH (Figure 22).

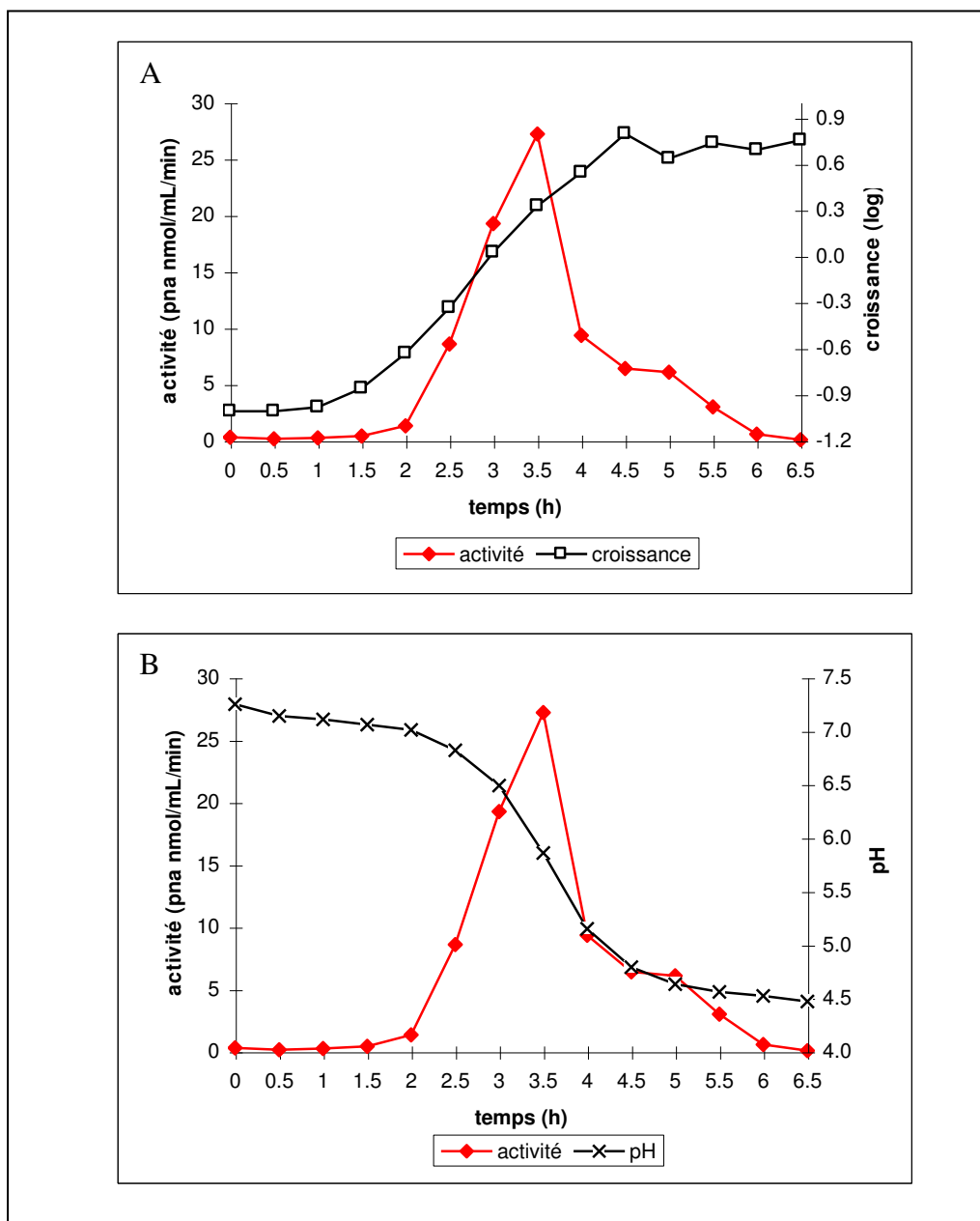


Figure 21. Evolution de l'activité enzymatique soluble en fonction du temps de croissance (suivi par mesure de la densité optique à 650 nm) de la souche 4F44 en milieu M17 (A) et en fonction de l'acidification du milieu (B).

Test enzymatique : 30 min d'incubation à 37°C de la fraction enrichie (par ultrafiltration à 50 kDa) en présence du substrat synthétique Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA à 0,5 mM dans Tris-HCl 100 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7

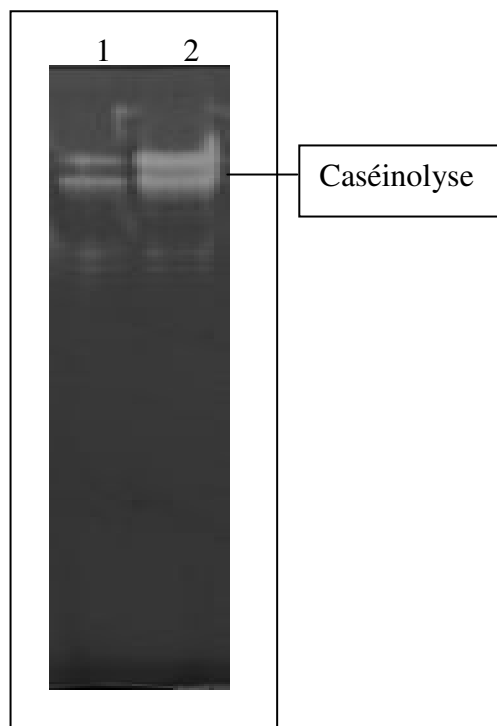


Figure 22. Influence du pH du milieu de croissance de la souche 4F44, sur l'activité enzymatique soluble. Révélation de l'activité caséinolytique par zymographie.

Le surnageant de culture après 6 h de croissance à 42°C en milieu M17 est analysé

1 : le milieu de culture récupéré à pH 4,6 après centrifugation (3900 g - 15 min - 4°C) a été filtré (0,45 µm)

2 : le milieu de culture contenant les bactéries a été neutralisé à pH 7,0 par addition de NaOH, les bactéries ont alors été éliminées par centrifugation (3900 g - 15 min - 4°C) et le milieu de culture filtré (0,45 µm).

3. Caractérisation de la protéase libre de *S. thermophilus* 4F44

3.1. Récupération d'une fraction enrichie en protéase libre

Le surnageant de culture de la souche 4F44 récupéré après 6 h de culture (pH du milieu = 4,6), a été centrifugé, filtré, dialysé et lyophilisé afin de réaliser une PAGE-SDS classique et une électrophorèse bidimensionnelle. Pour la PAGE-SDS (contrairement au zymogramme), l'échantillon a été chauffé et additionné de 2-mercaptoéthanol dans les conditions de Laemmli et Favre (1973). Pour la souche 4F44 les protéines qui doivent correspondre aux protéases détectées par zymographie sont deux protéines de masse moléculaire apparente voisine ou supérieure à 150 kDa. Ces protéines sont absentes dans l'échantillon témoin (surnageant de culture après croissance de la souche PB385) (Figure 23). L'électrophorèse bidimensionnelle, quant à elle, a permis de déterminer le point isoélectrique apparent de la protéine, proche de 4,5 (Figure 24).

Un protocole d'enrichissement de la fraction enzymatique, présenté dans le chapitre matériel et méthodes, basé sur la précipitation de cette protéine (Figure 17) a été utilisé afin de récupérer la protéase. Les fractions enrichies en enzyme ainsi obtenues ont été utilisées pour déterminer les séquences N- et C-terminales de la protéase et également pour en étudier leur activité protéolytique sur la caséine.

3.2. Détermination de la séquence amino-terminale de la protéase

Une fraction aliquote de la fraction enrichie a été déposée en PAGE-SDS. Les protéines, ainsi séparées, ont été soit révélées au bleu de Coomassie (Figure 25A) soit électrotransférées sur membrane de PVDF avant d'être révélées au rouge Ponceau. Deux bandes situées sur le gel PAGE-SDS et sur la membrane PVDF (Figure 25B) correspondent aux bandes protéiques actives détectées sur le zymogramme (Figure 25C). Les bandes 1 et 2 situées sur la membrane de PVDF ont été découpées et soumises à un micro-séquençage d'Edman. Dans les deux cas, une séquence amino-terminale de 10 résidus d'acides aminés a été déterminée. La séquence DELTSLVEK de la protéine correspondant à la bande 1, après interrogation des banques de données, est identique à la séquence aminotermale du propeptide de la protéine PrtS (déduite du gène *prtS* des souches LMD-9, CNRZ385 et JIM8232). La séquence NIDSNTITTV de la protéine correspondant à la bande 2 est identique à la séquence N-terminale de la forme mature de la protéase PrtS déterminée chez la souche CNRZ385 (Fernandez-Espla *et al.*, 2000), mais également identique à la séquence amino-terminale de la protéine mature (déduite du gène *prtS*) des souches LMD-9 et JIM8232.

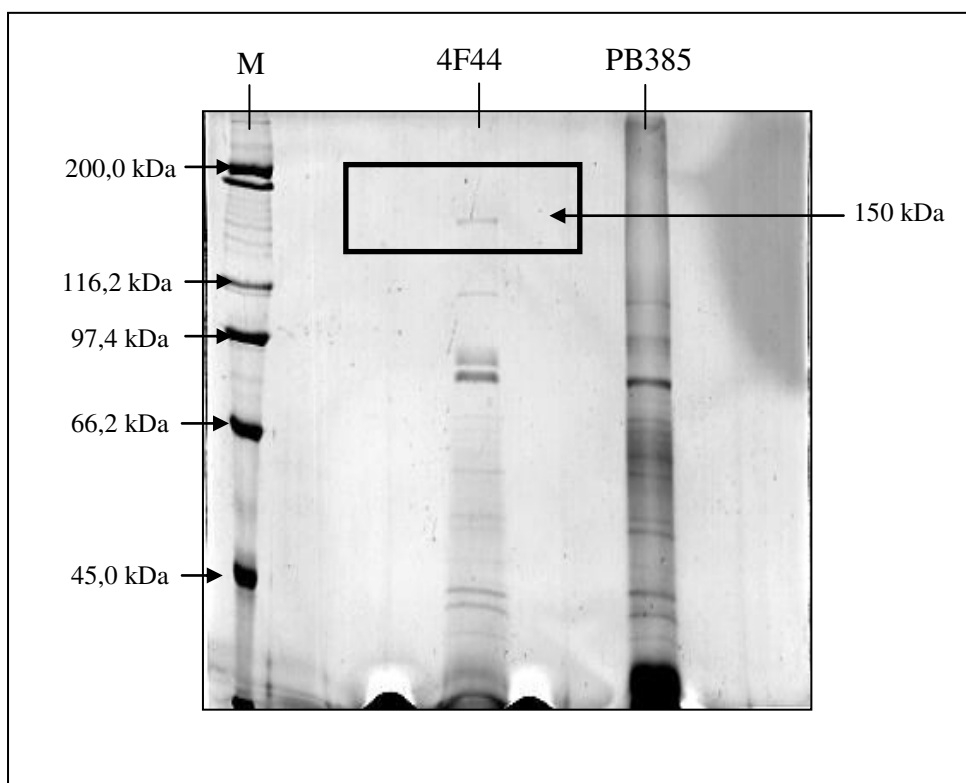


Figure 23. Détermination de la masse moléculaire apparente de la protéase soluble de la souche 4F44.

Electrophorèse en présence de SDS des surnageants de culture (5 h de croissance en milieu M17 à 42°C) filtrés (0,45 µm) et dessalés de la souche 4F44 et de la souche PB385 (souche de référence).

Coloration au bleu de Coomassie.

Localisation de la fraction enzymatique soluble dans le cadre.

M : myosine (200,0 kDa), β-galactosidase (116,2 kDa), phosphorylase b (97,4 kDa), sérum albumine bovine (66,2 kDa), ovalbumine (45,0 kDa).

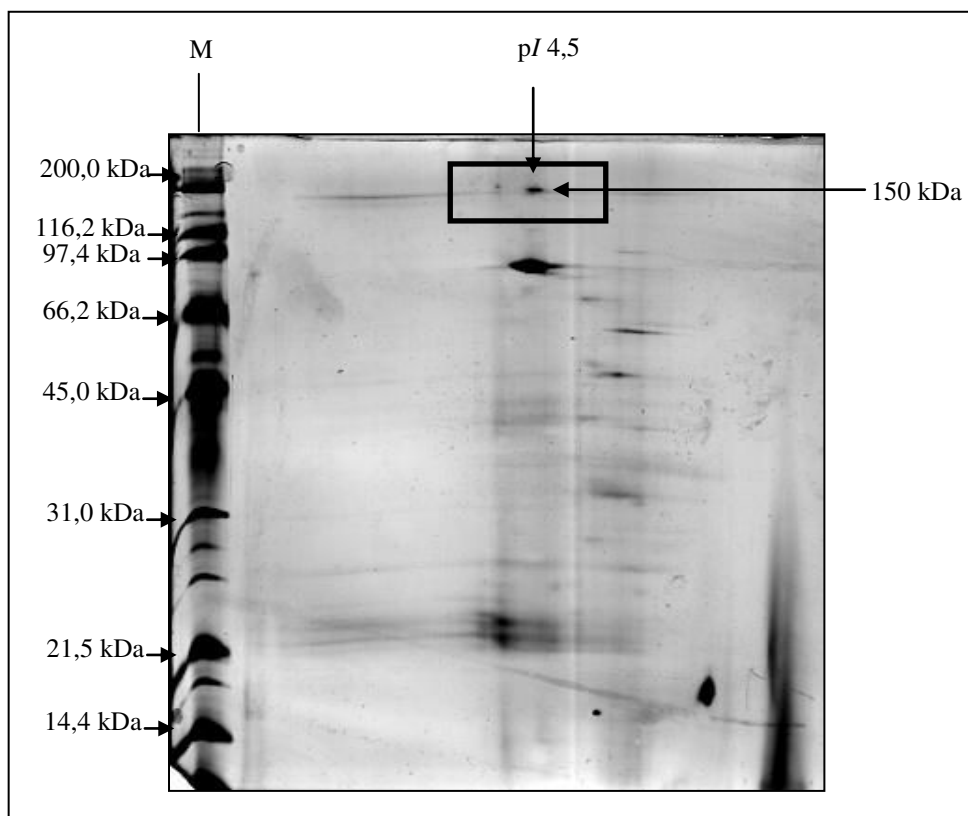


Figure 24. Profil électrophorétique bidimensionnel de la fraction enrichie en enzyme pour la détermination du point isoélectrique de la protéase soluble de la souche 4F44.

Révélation au nitrate d'argent.

Localisation de la fraction enzymatique soluble dans le cadre.

M : myosine (200,0 kDa), β -galactosidase (116,2 kDa), phosphorylase b (97,4 kDa), sérum albumine bovine (66,2 kDa), ovalbumine (45,0 kDa).

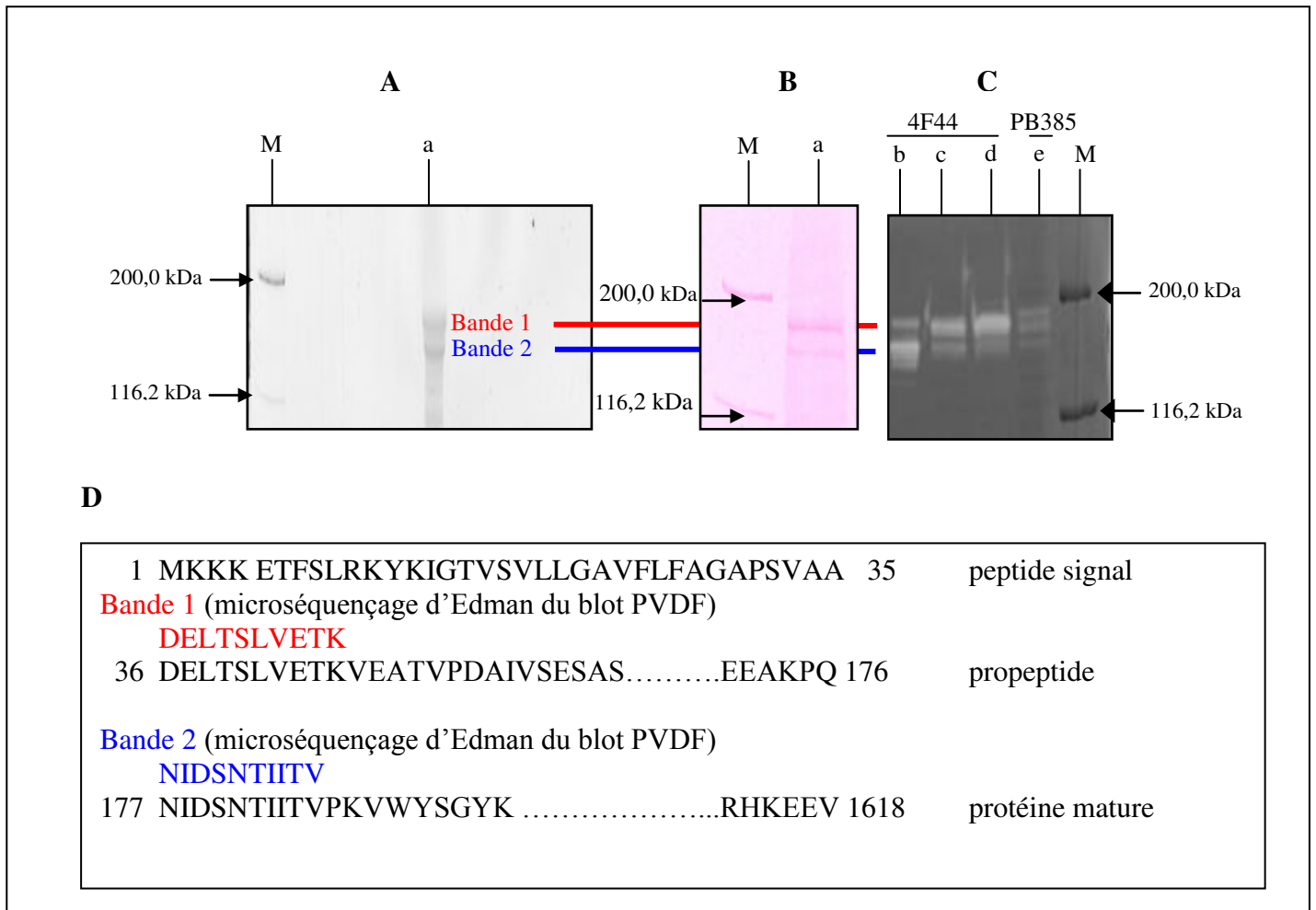


Figure 25. Profils électrophorétiques des protéines extraites du milieu de culture de *Streptococcus thermophilus* 4F44 (cultivée 6 h à 42°C en milieu M17) et alignements des séquences obtenues avec la séquence de la protéine PrtS de *S. thermophilus* LMD-9.

Echantillons : M : myosine (200,0 kDa), β -galactosidase (116,2 kDa) ; a : fraction enrichie en protéase soluble ; b : surnageant filtré du milieu de culture de la souche 4F44 ; c : contenu intracellulaire de la souche 4F44 ; d : fraction enzymatique pariétale de la souche 4F44 ; e : fraction enzymatique pariétale de la souche de référence PB385.

A : PAGE-SDS (coloration au bleu de Coomassie) ; **B** : électrotransfert sur membrane de PVDF des protéines du PAGE-SDS, coloration au rouge Ponceau, en vue de la détermination de la séquence N-terminale (dégradation d'Edman) ; **C** : zymogramme.

D : alignements des microséquences des protéines (Bande 1 et 2) de *S. thermophilus* 4F44 et de la séquence partielle de la protéine PrtS de *S. thermophilus* LMD-9

La bande 1 correspond aux 10 premiers résidus du propeptide de PrtS de LMD-9.

La bande 2 correspond aux 10 premiers résidus de PrtS mature de LMD-9.

Cette protéase soluble existe donc dans le milieu de culture sous deux formes : non mature (avec le prodomaine) et mature (sans le prodomaine). Le peptide signal et le propeptide sont éliminés lors de l'exportation et la maturation de l'enzyme.

3.3. Détermination de la séquence du gène *prtS* chez *S. thermophilus* 4F44

Dans une précédente étude (Galia *et al.*, 2009), la recherche du gène *prtS* (et du nombre de copies) chez les 30 souches de *S. thermophilus* du laboratoire a montré que l'ensemble des souches *prtS*⁺ ne présentait qu'une seule copie de gène.

S. thermophilus 4F44, faisant partie de cette étude, ne possède donc qu'une seule copie du gène *prtS*. La protéase PrtS se trouvant sous deux formes, libre et ancrée, il était donc intéressant de connaître la séquence complète du gène *prtS* de *S. thermophilus* 4F44. Le gène *prtS* a donc été amplifié par PCR en utilisant plusieurs couples d'amorces (Tableau 12). Ces amorces ont permis d'obtenir des produits de PCR d'environ 550 pb, chevauchants, qui ont ensuite été séquencés. Les séquences obtenues ont alors été assemblées en contig. Une séquence de 5892 pb a été obtenue (Figure 26). La comparaison de cette séquence avec celle de LMD-9 présente 100% de recouvrement, l'organisation génétique de ce contig est donc la suivante : le gène *prtS* est flanqué en amont d'une portion du gène *eriC* et en aval d'une portion du gène codant pour la transposase IS3. Cette organisation est classique et retrouvée chez les souches de *S. thermophilus prtS*⁺ (Figure 27) (Delorme *et al.*, 2010). La séquence obtenue est constituée d'une ORF de 4755 nucléotides codant pour la protéase PrtS, d'une région amont de 766 nt et d'une région aval de 371 nt.

Un site de fixation du ribosome (RBS) a été détecté. Il est localisé à 13 nt en amont du codon d'initiation de la traduction (Codon Start ATG) et la boîte -10 (TATATT box) est localisée 39 nt en amont de la séquence RBS. Une boîte codY (AATTTTCAGAATATA) est aussi présente 44 nt en amont de la TATA box. Aucun terminateur de transcription n'a été identifié.

En ne prenant en compte que la séquence codante du gène *prtS*, un pourcentage d'identité de 99% est trouvé entre le gène *prtS* de 4F44 et celui des souches de *S. thermophilus* CNRZ 385, LMD-9 et JIM8232. Ce pourcentage est de 97% quand ce gène est comparé à celui de différentes souches de *S. suis*.

Entre les souches de *S. thermophilus* possédant le gène *prtS*, deux groupes peuvent être constitués. Le groupe des souches ayant un allèle *prtS* proche de LMD-9 (dont toutes les souches séquencées par Galia *et al.*, 2009 et la souche JIM8232), car ces allèles présentent une particularité importante au niveau des 300 premières paires de bases (Figure 28), où une duplication imparfaite de 96 nt est observée.

1 TAGCATT TTTT TTAGATTGTC TTAACAAAGA GATGAGAAAA GTCCCAATAT TATAATGTTT CTGTTGTCTG
 71 GTCAACTTTC TCAATTCTGG AATGATTACA TCGGGAACAA AACTCCGAGG TAGCAGACCA ATCCGCATTT
 141 ATTTGGCAAT CCAGTAAGCA TCTTGCTTGT CAGTTTTCTG ACCTGTAATG GCCTTCATGT GGGCTGGTTG
 211 AGCAAGTATT ACCTCGAAGT CATCACATAG AGCATGCCAG ACAGGTCACC AATAGACACC TGTGCTTTCC
 281 ATACCAACAG CTTCACATG AAATTGACTG AGAAAAATCGT GGTAAGCACG TAGACCTTTA GTCGTTGTAT
 351 CAAATGTAGC TAAGTAACAC TTTGGACAAG TTGAGGGGAA TACAAACGAC AATGTGCGACT TGATCTACAC
 421 ATGATTATCT ATGACAATTC CTTCTTCTT AAAATTAGAG AGCCTATCTA CTGAATTTTA GTCATATTCT
 491 TGAGCGCATA TTGTAGTTCT TATCAGTAGG GTGGAGTAGT TTTGTCATCA TAATTAACAT TAATAATGCA
 561 CCAACAACAA GGCACCTCATT AGGTATATAA TCTTAGTGAG GGCTTTATGC TTATTTTCAT TAAGGACGGA
 631 GCCATCATGA ATGTCTTGCT CACTCCCTTT TTAGTGTGCA TTATCTGTAT CTATGGTTAT AGATATTATT

Boîte codY

701 GATAGCTAGT TATAGTTTGA AGAAATAACT GAAATTTTCAG AATATACTTG CGATGCCGAC AATTTTATGT

Boîte -10

RBS

Start

771 TTTAATATAT TTATTGGTTT TGCCAATAAT GAAGGAGAAA AACTAGGAGG AAAAGTTATG AAAAAAGAAAG
 841 AAACCTTTCTC ACTTCGGAAG TATAAAATTG GAACTGTGTC TGTTCTTTTG GGTGCAGTTT TTTTGTTTGC
 911 AGGTGCACCA TCGGTAGCTG CAGATGAATT GACAAGCCTT GTAGAGACTA AGGTGGAAGC AACTGTTCCCT
 981 GACGCAATCG TCAGCGAATC AGCCTCAGAA AGTCCCCTAG CCGAGGAGTT GGTGACACT TCTGTGGAGG
 1051 CTACCTCAAC TGATGTAACC ACTACAGATA ATGAAGAGGA AACACCTGGC TCAGAAGCTC TTGAAAACAG
 1121 CGCAAATACA GAAGTAGAAA CAACTCAACC AGCTGTAGAA ACTCCAGCTA TTTCAGAGAA AAAAGTAGAA
 1191 GAAGAGGAGA AGCTTTCCGT AGCAGATGAG ACTACTGCTA TTACGAATCA GGAAGAAGCG AAACCACAAA
 1261 ACATCGATAG TAATACGATC ATTACAGTAC CTAAGTTTG GTATAGTGGT TACAAGGGCG AAGGAACAGT
 1331 AGTTGCAATC ATAGATTCCG GTCTTGACGT TGACCACGAT GTATTGCATA TTTCAGACCT CTCAACTGCA
 1401 AAATATAAAT CAGAAAAAGA GATAGAAGCA GCTAAAGAAG CTGCAGGAAT TACCTACGGT GAATGGTTTA
 1471 ACGATAAGGT TGTATTTGGT TATAACTATG TTGATGTGAA TACTGTCTTG AAAGAAGAAG ACAAACGTTT
 1541 ACACGGTATG CACGTAACAA GTATTGCCAC AGGAAATCCG ACACAACCAG TCGCTGGACA ATTAATGTAT
 1611 GGTGTAGCTC CTGAAGCGCA AGTCATGTTT ATGCGTGTAT TCTCAGACCT CAAAGCTACA ACAGGCGCAG
 1681 CATTGTACGT AAAGGCGATT GAAGATGCTG TAAAATTGGG TGCAGATAGC ATCAACCTCA GTCTGGGAGG
 1751 AGCTAACGGC TCTGTTGTTA ACATGAATGA AAATGTGACT GCAGCAATCG AGGCTGCTCG TCGTGCAGGG
 1821 GTTTCTGTTG TTATTGCAGC TGGTAATGAT GGAACATTTG GTTCAGGTCA TTCTAATCCG TCAGCCGATT
 1891 ATCCAGATTA TGGCTTAGTC GGTGCTCCTT CAACAGCTCA CGATGCAATT TCTGTGCTT CTTACAATAA
 1961 CACAACGGTT GGTAGTAAAG TAATTAATAT CATTGGCTTA GAAAACAATG CTGACTTGAA TTACGGCAAG
 2031 AGTTCGTTTG ATAATCCAGA GAAAAGTCCC GTACCATTTG AAATCGGGAA AGAATATGAA TATGTCTATG
 2101 CGGGAATCGG TCAAGCTTCG GATTTTGATG GTCTAGATTT GACTGGAAAA CTTGCACTCA TCAAACGAGG
 2171 AACGATTACC TTCTCAGAAA AAATAGCCAA TGCAACAGCT GCAGGTGCAG TAGGGGTGGT CATTTTCAAT
 2241 AGTCGTCCAG GTGAAGCCAA TGTAAGCATG CAACTTGATG ATACAGCTAT TGCAATTCCA TCTGTCTTCA
 2311 TTCCATTGGA ATTTGGTGAG GCTTTGGCAG CTAACTCATA TAAGATTGCG TTCAATAACG AAACGGATAT
 2381 TCGCCCTAAC CCAGAAGCAG GTCTTCTTTC AGATTTTTC AAGTTGGGGT TATCAGCGGA TGGCGAGCTA
 2451 AAACCAGACT TAGCTGCTCC AGGTGGTGCT ATTTATGCAG CCATCAATGA TAATGACTAT GCCAACATGC
 2521 AGGGAACAAG TATGGCTTCT CCACACGTGG CAGGAGCAGC CGTACTTGTA AAACAGTATT TACTGGCAAC
 2691 TTACCCTACT AAGTCCCCTC AAGAAATCGA AGCCTTAGTA AAACACTTGC TTATGTCTAC TGCTAAAGCA
 2761 CATGTGAACA AAGAAACAAC AGCCTACACT TCCCCACGCC AACAAAGTGC AGGTATCATT GATACTGCAG
 2831 CAGCTATTTT TACAGGTTTA TATTTGACTG GCGAAGATGG GTATGGCAGC ATTACCTTGG GAAATGTTGA
 2901 GGATACATTC AGCTTTACGG TCACACTTCA TAATATTACA AACGAAGATA AGACTTTAAA CTACTCAACA
 2971 CAATTACCAA CGGATACTGC TCAAACGGGA TTGATCACCT TGTACTCCAG TCTATTAGCA GAGATCTCTG
 3041 GCGGTAAGGT GACTGTGAAA GCCAATTCAA GTACAACCTT TACAATTAAT GTCGATGCAT CAAGCTTTGC
 3111 AGAAGAATTG ACAGGTTTGA TGAAAAATGG TTACTATCTT GAAGGTTTTG TTCGATTTAC AGATGTAGCC
 3181 GACGACGGTG ATATTGTCAG CATTCCATAC GTTGGTTTTCC GTGGGGAATT CCAAAATCTA GCCGTTCTAG
 3251 AAGAGCCGAT TTACAATCTT ATTGCCGATG GTAAGGGGGG CTTCTACTTT GAACCTGTTA CAGCACAGCC
 3321 AAATACTGTT GACATTAGCC ATCACTACAC AGGTCTTGTT ACAGGAAGTA CGGAGTTAAT CTATTCTACA
 3391 GACAAACGAT CTGACTCTGC GATCAAGACT CTTGGTACAT TTAAAAATAA AGCAGGATAC TTTGTTTTAG
 3361 AGCTTGATGA GTCTGGTAAA CCTCATTTAG CTATCTCGCC AAATGGGGAT GACAACCAAG ATTCGCTCGT
 3431 TTTCAAAGGT GTCTTCTTGA GAAATTATAC TGATTTAGTC GCAAGCGTCT ATGCTGCAGA TGATACTGAG
 3501 CGAACAAATC CACTTTGGGA AAGTCAACCA CAGTCAGGCA ATAAGAACTT CTATAGTGGT GATCCTAAAA
 3571 ATCCAAAATC AAGCATTATT TACCCTACTG AATGGAATGG GACAGACAGC GAGGGAAATG CTTTAGCAGA
 3641 TGGTAAGTAT CAATACGTTT TGACCTACTC ATCTGAAGTT CCAGGTGCAG CAGTACAAAC TATGATTTTC
 3711 GACGTTATCA TCGATAGAGA ATCACCAGTT ATCACCACAG CTACCTATGA TGAAACAAAC TTTACATTTA
 3781 ACCCTCGTCC AGCCATTGAA AAAGGAGAAT CCGGTCTATA TCGCGAGCAA GTATTCTACC TTGTAGCAGA
 3851 TGCAAGCGGT GTGACAACCA TTCCTTCTT ATTAATAAAT GGTGATGTAA CCGTTTCTGA TAATAAGGTA
 3921 TTTGTGGCAC AAAACGATGA TGGCTCCTT ACATTGCCCT TGTATCTTGC AGATATTTCA AAATTCTACT
 3991 ACACAGTGGA GGATTATGCT GGTAAACATCA GCTATGAAAA AGTAGAGAAT CTGATCAGTA TTGGCAATGA

```

4061 AAAAGGGTTG GTAAGTGTCA ATATTCTTGA TAAAGATACA AATAGTCCTG TACCAATACT TTTCTCTTAC
4131 TCAGTCACCG ATGAAACAGG CAAGATTGTT GCAGAATTAC CACGATATGC CGGCGATACT AGCGTTCCTTA
4201 AGCTACCATT TGGTACTTAC ACCTTTGATT TATTCTTATA TGATACAGAG CGGTCAAGCC TAGCAGGTGA
4271 AACAAAAGCA GTCGTGACGA TTTTGGAAGA TAATAGCACT GCCGAGGTGA ATTTCTATGT GACTTTGAAA
4341 GATAAGGCTA ACTTGCTGAT AGATATTGAT GCATTACTAC CTTCTGGTTC AACCATCCAA CTGGTAACTG
4411 CTGATGGTCA GGCTATTTCAG CTACCAAATG CTAAATATTC TAAGACTGAT TATGGTAAAT TTGTACCAGT
4481 TGGTACCTAC ACTATCCTTC CAACCCTCCC AGAAGGCTAT GAATTTTTTG AAGAATTAGA CGTAGCAGTA
4551 CTTGCAAACC AGTCAAATGT TAAGAAATTA ACCTTGATTA ATAAAGTTGC TTTGAAAGAA CTGATTGCTG
4621 AACTTGCAGG ACTTGAAGAA ACAGCGCGTT ATTACAATGC TAGTCCAGAA CTTCAAACCTG CCTATGCTAA
4691 AGCATTAGAA GATGCCAATG CAGTATATGC CAATAAACAC AATCAGGCAC AAGTAGATTC AGCACTTGCC
4761 AGTCTTGTGG CGGCGAGAGA ACAGCTAAAC GGTCAAGGTA CCGATAAGGA AAAACTAATT GCTGAAGTAT
4831 CAAACTACAC ACCGACTCAG GCAAACCTTTA TTTATTACAA TGCTGAAAAT ACCAAACAAA TTGCCTATGA
4901 TACAGCTGTT CGTTCAGCAC AACTTGTATT GAACCAAGAG AATGTAACCTC AGGCAGTTGT CAACCAAGCG
4971 TTGGCTGACT TGTTAGCAGC GAAAGCCAAC TTAGATGGTC AAAAGACTGA TATTTTCAGCC CTTTCGTAGCG
5041 CAGTATCTGT TTCTTCCGTA TTAAAAGCGA CAGATGCTAA GTATCTCAAT GCATCTGAGA ACGTGAAACA
5111 AGCTTATGAC CAGGCAGTTG AAGCAGCGAA AGCGATTCTA GTTGATGAAT CTGCAAGCCA AGCAAGTGTG
5181 GATCAAGCTC TAGCCGTTCT GACAAGCGCT CAGGCAGAAC TGGATGGTGT TGCTACTTCA ACAAATGATG
5251 CCAAAGAGCC AGCAAATACT GCCACTGACA AAAAAGATGA AGGCACTGTA ACGCCTCCAC CTATAGACTC
5321 AGAAATAGTT GATGTACAGG CACCTCCTGT AAAAGATACT GGGAAATTCAG AGCATGTACC GATAAGTCAG
5391 AAGCCAAACC CTCAACCAAC TTTACCTCGT CCAGTCACTT TGCAAGCTAG TCTATCTAGT CCTAATCAAG
5461 AAAAACAGGT GACTCAACTA CCAAATACTG GAGAAAATGA TACGAAATAC TATCTTGTTC CTGGTGTCACT
Stop
5531 TATTGGGCTA GGGACTCTGT TGGTAAGCAT ACGACGTCAC AAGGAAGAAG TATAACCAAC ACTAGCTTTA
5601 TCACAAGTTT GCTAAATAAT AAAACCGCTT AATCATTGTG ATATACTCCC CTTATAGTGG ACAGTGAAAA
5681 AACAAAAATT TTCACTAGAA ACTATAAAGG GAGTTTTTATT ATGTCCAAA GAAGTCCAAA GTCTATCTCT
5751 GAGAACTAG AAATTGTTCT ACTCCACTTG GAAGCTGGGA AATCACTTAG CTGGTTAGCT AGGCGCTATG
5821 GTGTGTCTAA AGACACTCTA TCAAACCTGGG TTCGGAAGTA CAAAGAAGCT GGTGTTGATG GGCTAGAGGA
5891 AAGCCGTCAA TGGAAGAAGT ATAGTAAGGA ACTAAAGGAA CAAGCTGTTT CCGACTATCT TAATGGCTTG
5961 GGAAGTC

```

Figure 26. Séquence nucléotidique obtenue après séquençage de la région codant la protéase PrtS de *Streptococcus thermophilus* 4F44.

Les séquences correspondantes aux boîtes Cod Y et – 10 (TATA Box), au site de fixation du ribosome (RBS), aux codons d'initiation (START) et de fin (STOP) de la traduction pour la protéine PrtS sont encadrées.

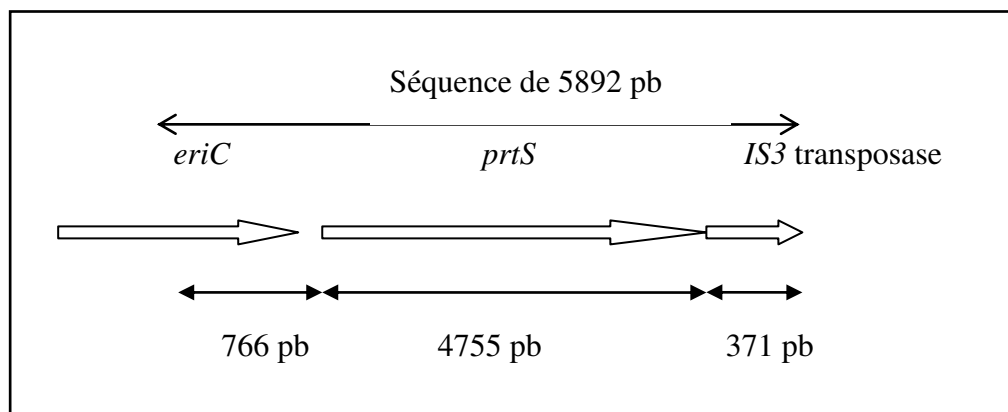


Figure 27. Organisation génétique de la région du gène *prtS* de *Streptococcus thermophilus* 4F44.

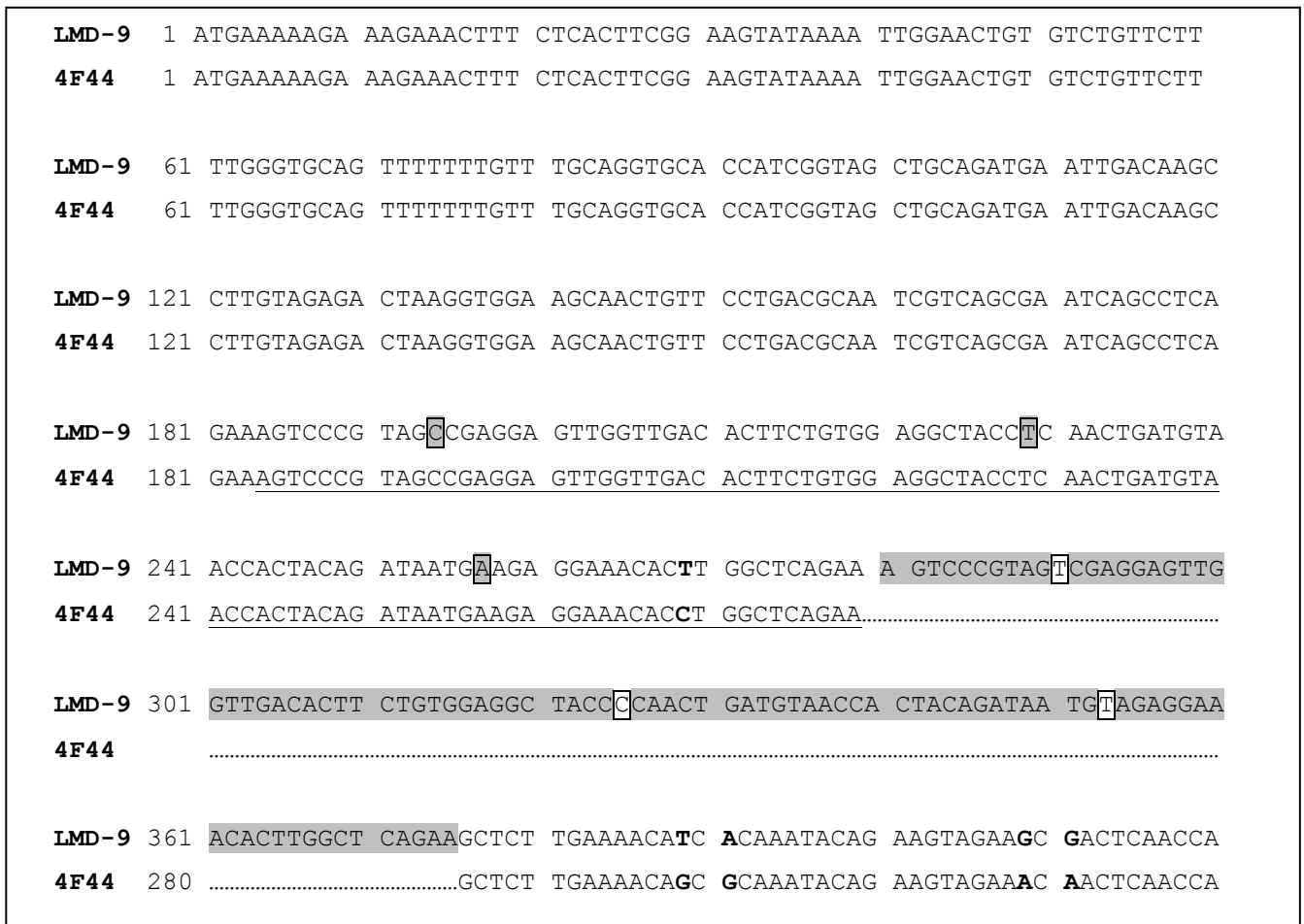


Figure 28. Alignement des séquences partielles des gènes *prtS* de *Streptococcus thermophilus* LMD-9 et 4F44 pour mettre en évidence l'absence de la duplication imparfaite de 96 nt retrouvée chez la souche 4F44.

La séquence de la souche 4F44 (GI : 284080586) correspondant à la séquence qui est dupliquée chez la souche LMD-9 (GI:116100249), est soulignée. La duplication de séquence chez la souche LMD-9 est grisée. La duplication étant imparfaite, les mutations entre les deux séquences dupliquées sont encadrées chez LMD-9. Les différences entre les deux allèles sont notifiées en gras.

L'autre groupe de souches, où cette duplication de 96 nt est absente, contient les souches 4F44 et CNRZ385. Cette absence de duplication a également été observée chez différentes souches de *S. suis* pour le gène *sspA* codant pour une protéine homologue à PrtS.

3.4. Détermination de la séquence protéique à partir du gène *prtS* de *S. thermophilus* 4F44

La séquence de la protéine PrtS déduite de la séquence nucléotidique (composée de 4758 nt) correspond à une protéase de 1585 résidus d'acides aminés (contre 1618 résidus pour l'allèle LMD-9). Elle présente 99 à 96% d'identité avec la structure primaire de la protéase PrtS de différentes souches de *S. thermophilus* (CNRZ385, LMD-9, et JIM8232) et 97 à 45% d'identité avec la structure primaire de protéases de différentes espèces de streptocoques (Tableau 15).

Tableau 15. Pourcentages d'identité entre la séquence protéique PrtS de *Streptococcus thermophilus* 4F44 et celle d'autres souches de *S. thermophilus* ou d'autres espèces de streptocoques.

Espèce	Souche	% identité
<i>S. thermophilus</i>	CNRZ385	99%
<i>S. thermophilus</i>	LMD-9	97%
<i>S. suis</i>	05HAS68	97%
<i>S. suis</i>	89/1591	97%
<i>S. suis</i>	GZ1	97%
<i>S. suis</i>	P1/7	97%
<i>S. thermophilus</i>	JIM 8232	96%
<i>S. gallolyticus</i>	UCN34	54%
<i>S. dysgalactiae</i>	ATCC 27957	53%
<i>S. agalactiae</i>	2603V/R	51%
<i>S. infantarius</i>	ATCC BAA-102	50%
<i>S. gordonii</i>	CH1	47%
<i>S. parasanguinis</i>	ATCC 903	47%
<i>S. sanguinis</i>	SK678	46%
<i>S. australis</i>	ATCC 700641	46%
<i>S. oralis</i>	ATCC 35037	45%
<i>S. mitis</i>	ATCC 6249	45%

L'alignement des différentes séquences présenté en figure 29, prend en compte les différents allèles *prtS* mais aussi le gène de la protéase de *S. suis* 89/1591 qui présente 97% d'identité avec la protéase de *S. thermophilus* 4F44. Cette protéase est structurée en domaines. A l'extrémité N-terminale, la séquence signal de 35 résidus d'acides aminés est identique entre toutes les protéines. Ce peptide signal n'a pas été retrouvé lors du séquençage de la protéase libre, en effet, il est normalement éliminé par une "signal peptidase" lors de la sécrétion.

Le prodomaine de la protéase PrtS de *S. thermophilus* 4F44, semblable à celui de *S. thermophilus* CNRZ385 et *S. suis* 89/1591, ne présente pas de duplication, il est plus court de 32 résidus d'acides aminés par rapport au prodomaine de la protéase PrtS de *S. thermophilus* LMD-9 qui présente une duplication imparfaite tout comme celui de *S. thermophilus* JIM8232.

Cette duplication de 32 résidus d'acides aminés est due à la duplication de 96 pb au niveau de la séquence nucléotidique et est retrouvée chez de nombreuses souches et serait utile lors de la maturation par des maturases (Galia *et al.*, 2009 ; Delorme *et al.*, 2010) (Figure 28, néanmoins le phénomène de maturation de PrtS n'est pas connu chez *S. thermophilus*).

Le domaine PR, composé de 495 résidus d'acides aminés est très similaire entre toutes les protéases (Figure 29).

Le domaine A est la portion de protéine PrtS de *S. thermophilus* qui diverge le plus avec celui des autres souches. Notamment entre la souche CNRZ385, qui présente une séquence très différente (Figure 29) et les souches LMD-9 et 4F44. Cette différence majeure est localisée entre les positions 721 et 739. Cette différence résulte au niveau du gène de deux décalages de phase de lecture, le premier (+1, addition d'une adénine) à la position 2072 et le second (-1, perte d'une thymine) à la position 2121 pour l'allèle de la souche CNRZ385 (Figure 30).

Enfin, les séquences C-terminales composées des domaines H, W et du domaine d'ancrage à la paroi sont semblables.

Le domaine H est composé de 367 résidus d'acides aminés et le domaine W de 106 résidus d'acides aminés.

Le domaine d'ancrage composé de 35 résidus d'acides aminés où se trouve la séquence cible de la sortase A (motif LPNTG) permet l'ancrage de la protéase à la paroi (Figure 31).

Résultats - Partie I

	Peptide signal				Propeptide				
	1	10	20	30	40	50	60		
LMD-9	MKKKETFSLR	KYKIGTVSVL	LGAVFLFAGA	PSVAADELTS	LVETKVEATV	PDAIVSESAS			
JIM8232	MKKKETFSLR	KYKIGTVSVL	LGAVFLFAGA	PSVAADELTS	LVETKVEATV	PDAIVSESAS			
CNRZ385	MKKKETFSLR	KYKIGTVSVL	LGAVFLFAGA	PSVAADELTS	LVETKVEATV	PDAIVSESA-			
4F44	MKKKETFSLR	KYKIGTVSVL	LGAVFLFAGA	PSVAADELTS	LVETKVEATV	PDAIVSESA-			
<i>S. suis</i>	MKKKETFSLR	KYKIGTVSVL	LGAVFLFAGA	PSVAADELTS	LVETKVEATV	PDVIVSESA-			
	*****	*****	*****	*****	*****	** . *****			
	61	70	80	90	100	110	120		
LMD-9	ESPVAEELVD	TSVEATSTDV	TTTDNEEETL	GSESPVVEEL	VDTSVEATPT	DVTTTDNVEE			
JIM8232	ESPVAEELVD	TSVEATSTDV	TTTDNEEETL	GSESPVVEEL	VDTSVEATST	DVTTTDNVEE			
CNRZ385	-----	-----	-----	-SESPVVEEL	VDTSVEATST	DVTTTDNEEE			
4F44	-----	-----	-----	-SESPVAEEL	VDTSVEATST	DVTTTDNEEE			
<i>S. suis</i>	-----	-----	-----	-SESPVVEEL	VDTSVEATEP	DVTTTDNVEE			
				***** . ***	***** . *	***** **			
								Domaine Pr	
	121	130	140	150	160	170	180		
LMD-9	TLGSEALENI	TNTEVEATQP	AVETPAISEK	KVEEEEKLSV	ADETTAITNQ	EEAKPQNIDS			
JIM8232	TLGSEALENI	TNTEVEATQP	AVETPAISEK	KVEEEEKLSV	ADETTAITNQ	EEAKPQNIDS			
CNRZ385	TPGSEALENS	ANTEVETTQP	AVETPAISEK	KVEEEEKLSV	ADETTAITNQ	EEAKPQNIDS			
4F44	TPGSEALENS	ANTEVETTQP	AVETPAISEK	KVEEEEKLSV	ADETTAITNQ	EEAKPQNIDS			
<i>S. suis</i>	TLGSEALENI	TNTEVATQP	AVETPAISEK	KVEEEEKLV	ADETTAITNQ	EEAKPQNIDS			
	*****	:*****:***	*****	*****:	*****	*****			
	181	190	200	210	220	230	240		
LMD-9	NTIITVPKVW	DSGYKGEQTV	VAIIDSGLDV	DHDVHLISDL	STAKYKSEKE	IEAAKEVAGI			
JIM8232	NTIITVPKVW	DSGYKGEQTV	VAIIDSGLDV	DHDVHLISDL	STAKYKSEKE	IEAAKEVAGI			
CNRZ385	NTIITVPKVW	YSGYKGEQTV	VAIIDSGLDV	DHDVHLISDL	STAKYKSEKE	IEAAKEAAGI			
4F44	NTIITVPKVW	YSGYKGEQTV	VAIIDSGLDV	DHDVHLISDL	STAKYKSEKE	IEAAKEAAGI			
<i>S. suis</i>	NTIITVPKVW	DSGYKGEQTV	VAIIDSGLDV	DHDVHLISDL	STAKYKSEKE	IEAAKEAAGI			
	*****	*****	*****	*****	*****	***** . ***			
	241	250	260	270	280	290	300		
LMD-9	SYGEWFNDKV	VFGYNYVDVN	TVLKEEDKRS	HGMHVTSIAT	GNPTQPVAGQ	LMYGVAPEAQ			
JIM8232	SYGEWFNDKV	VFGYNYVDVN	TVLKEEDKRS	HGMHVTSIAT	GNPTQPVAGQ	LMYGVAPEAQ			
CNRZ385	TYGEWFNDKV	VFGYNYVDVN	TVLKEEDKRS	HGMHVTSIAT	GNPTQPVAGQ	LMYGVAPEAQ			
4F44	TYGEWFNDKV	VFGYNYVDVN	TVLKEEDKRS	HGMHVTSIAT	GNPTQPVAGQ	LMYGVAPEAQ			
<i>S. suis</i>	TYGEWFNDKV	VFGYNYVDVN	TVLKEEDKRS	HGMHVTSIAT	GNPTQPVAGQ	LMYGVAPEAQ			
	:*****	*****	*****	*****	*****	*****			

Résultats - Partie I

	301	310	320	330	340	350	360
LMD-9	VMFMRVFS	DL	KATTGAALYV	KAIEDAVKLG	ADSINLSLGG	ANGSVVNMNE	NVTAAIEAAR
JIM8232	VMFMRVFS	DL	KATTGAALYV	KAIEDAVKLG	ADSINLSLGG	ANGSVVNMNE	NVTAAIEAAR
CNRZ385	VMFMRVFS	DL	KATTGAALYV	KAIEDAVKLG	ADSINLSLGG	ANGSVVNMNE	NVTAAIEAAR
4F44	VMFMRVFS	DL	KATTGAALYV	KAIEDAVKLG	ADSINLSLGG	ANGSVVNMNE	NVTAAIEAAR
<i>S. suis</i>	VMFMRVFS	DL	KATTGAALYV	KAIEDAVKLG	ADSINLSLGG	ANGSVVNMNE	NVTAAIEAAR
	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
	361	370	380	390	400	410	420
LMD-9	RAGVSVVIAA	GNDGTFGSGH	SNPSADYPDY	GLVGAPSTAR	DAISVASYNN	TTVGSKVINI	
JIM8232	RAGVSVVIAA	GNDGTFGSGH	SNPSADYPDY	GLVGAPSTAR	DAISVASYNN	TTVGSKVINI	
CNRZ385	RAGVSVVIAA	GNDGTFGSGH	SNPSADYPDY	GLVGAPSTAH	DAISVASYNN	TTVGSKVINI	
4F44	RAGVSVVIAA	GNDGTFGSGH	SNPSADYPDY	GLVGAPSTAH	DAISVASYNN	TTVGSKVINI	
<i>S. suis</i>	RAGVSVVIAA	GNDGTFGSGH	SNPSADYPDY	GLVGAPSTAR	DAISVASYNN	TTVGSKVINI	
	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
	421	430	440	450	460	470	480
LMD-9	IGLENNADLN	YGKSSFDNPE	KSPVPFEIGK	EYEVVYAGIG	QASDFDGLDL	TGKLALIKRG	
JIM8232	IGLENNADLN	YGKSSFDNPE	KSPVPFEIGK	EYEVVYAGIG	QASDFDGLDL	TGKLALIKRG	
CNRZ385	IGLENNADLN	YGKSSFDNPE	KSPVPFEIGK	EYEVVYAGIG	QASDFDGLDL	TGKLALIKRG	
4F44	IGLENNADLN	YGKSSFDNPE	KSPVPFEIGK	EYEVVYAGIG	QASDFDGLDL	TGKLALIKRG	
<i>S. suis</i>	IGLENNADLN	YGKSSFDNPE	KSPVFEIGK	EYEVVYAGIG	QASDFDGLNL	IGKLALIKRG	
	*****	*****	****	*****	*****	*****	*****
	481	490	500	510	520	530	540
LMD-9	TISFSEKIAN	ATAAGAVGVV	IFNSRPDEAN	VSMQLDDTAI	AIPSVFIPLE	FGEALAANSY	
JIM8232	TISFSEKIAN	ATAAGAVGVV	IFNSRPDEAN	VSMQLDDTAI	AIPSVFIPLE	FGEALAANSY	
CNRZ385	TITFSEKIAN	ATAAGAVGVV	IFNSRPGEAN	VSMQLDDTAI	AIPSVFIPLE	FGEALAANSY	
4F44	TITFSEKIAN	ATAAGAVGVV	IFNSRPGEAN	VSMQLDDTAI	AIPSVFIPLE	FGEALAANSY	
<i>S. suis</i>	TISFSEKIAN	ATAAGAVGVV	IFNSRPGEAN	VSMQLDDTAI	AIPSVFIPLE	FGEALASNSY	
	**	*****	*****	*****	*****	*****	*****
	541	550	560	570	580	590	600
LMD-9	KIAFNNETDI	RPNPEAGLLS	DFSSWGLSAD	GELKPDLAAP	GGAIYAAIND	NDYANMQGTS	
JIM8232	KIAFNNETDI	RPNPEAGLLS	DFSSWGLSAD	GELKPDLAAP	GGAIYAAIND	NDYANMQGTS	
CNRZ385	KIAFNNETDI	RPNPEAGLLS	DFSSWGLSAD	GELKPDLAAP	GGAIYAAIND	NDYANMQGTS	
4F44	KIAFNNETDI	RPNPEAGLLS	DFSSWGLSAD	GELKPDLAAP	GGAIYAAIND	NDYANMQGTS	
<i>S. suis</i>	KIAFNNETDI	RPNPEAGLLS	DFSSWGLSAD	GELKPDLAAP	GGAIYAAIND	NDYANMQGTS	
	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****

Résultats - Partie I

	601	610	620	630	640	650	660
LMD-9	MASPHVAGAA	VLVKQYLQAT	YPTKSPQEIE	ALVKHLLMST	AKAHVNKETT	AYTSPRQQGA	
JIM8232	MASPHVAGAA	VLVKQYLQAT	YPTKSPQEIE	ALVKHLLMST	AKAHVNKETT	AYTSPRQQGA	
CNRZ385	MASPHVAGAA	VLVKQYLLAT	YPTKSPQEIE	ALVKHLLMST	AKAHVNKETT	AYTSPRQQGA	
4F44	MASPHVAGAA	VLVKQYLLAT	YPTKSPQEIE	ALVKHLLMST	AKAHVNKETT	AYTSPRQQGA	
<i>S.suis</i>	MASPHVAGAA	VLVKQYLQAT	YPTKSPQEIE	ALVKHLLMST	AKAHVNKETT	AYTSPRQQGA	
	*****	*****	**	*****	*****	*****	*****

Domaine A

	661	670	680	690	700	710	720
LMD-9	GIIDTAAAIS	TGLYLTGEDG	YGSITLGNVE	DDFSFTVTLH	NITNEDKTLN	YSTQLTTDTV	
JIM8232	GIIDTAAAIS	TGLYLTGEDG	YGSITLGNVE	DDFSFTVTLH	NITNEDKTLN	YSTQLTTDTV	
CNRZ385	GIIDTAAAIS	TGLYLTGEDG	YGSITLGNVE	DDFSFTVTLH	NITNEDKTLN	YSTQLTTDTA	
4F44	GIIDTAAAIS	TGLYLTGEDG	YGSITLGNVE	DDFSFTVTLH	NITNEDKTLN	YSTQLTTDTA	
<i>S.suis</i>	GIIDTAAAIS	TGLYLTGEDG	YGSITLGNVE	DIFSFTVTLH	NITNEDKTLN	YSTQLTTDTV	
	*****	*****	*****	*	*****	*****	*****

	721	730	740	750	760	770	780
LMD-9	QNLITLAPR	LLAEIPGGKV	TVQANSSTTV	TINVDASSFA	EELTGLMKNG	YLEGFVRFT	
JIM8232	QNLITLAPR	LLAEIPGGKV	TVQANSSTTV	TINVDASSFA	KELTGLMKNG	YLEGFVRFT	
CNRZ385	QKRIDLHGST	SISRDSWRKV	TVKANSSTTV	TINVDASSFA	EELTGLMKNG	YLEGFVRFT	
4F44	QNLITLAPR	LLAEIPGGKV	TVKANSSTTV	TINVDASSFA	EELTGLMKNG	YLEGFVRFT	
<i>S.suis</i>	QNLITLAPC	LLAEIPGGKV	TVKANSSTTV	TINVDASSFA	EELTGLMKNG	YLEGFVRFT	
	*: :	*..	::: .	**	**:*	*****	*****

	781	790	800	810	820	830	840
LMD-9	DVADGGDIVS	IPYIGFRGEF	QNLAVLEEPI	YNLIADGKGG	FYFEPVTAQP	DSVDISHHYT	
JIM8232	DVADGGDIVS	IPYIGFRGEF	QNLAVLEEPI	YNLIADGKGG	FYFEPVTAQP	DSVDISHHYT	
CNRZ385	DVADDGDIVS	IPYVGFGEF	QNLAVLEEPI	YNLIADGKGG	FYFEPVTAQP	NTVDISHHYT	
4F44	DVADDGDIVS	IPYVGFGEF	QNLAVLEEPI	YNLIADGKGG	FYFEPVTAQP	NTVDISHHYT	
<i>S.suis</i>	DVADVGDIVS	IPYVGFGEF	QNLAVLEEPI	YNLIADGKGG	FYFEPVTAQP	DTVDISHHYT	
	****	*****	***:*	*****	*****	*****	:::*****

	841	850	860	870	880	890	900
LMD-9	GLVTGSTELI	YSTDKRSDFA	IKKTLGTFKN	EAGYFVLELD	ESGKPHLAIS	PNGDDNQDSL	
JIM8232	GLVTGSTELI	YSTDKRSDFA	IKKTLGTFKN	EAGYFVLELD	ESGKPHLAIS	PNGDDNQDSL	
CNRZ385	GLVTGSTELI	YSTDKRSDSA	IK-TLGTFFKN	KAGYFVLELD	ESGKPHLAIS	PNGDDNQDSL	
4F44	GLVTGSTELI	YSTDKRSDSA	IK-TLGTFFKN	KAGYFVLELD	ESGKPHLAIS	PNGDDNQDSL	
<i>S.suis</i>	GLVTGSTELI	YSTDKRSDFA	IK-TLGTFFKN	EAGYFVLELD	ESGKPHLAIS	PNGDDNQDSL	
	*****	*****	*	**	****	:*****	*****

Résultats - Partie I

	901	910	920	930	940	950	960
LMD-9	AFKGVFLRNY	TDLVASVYAA	DDTERTNPLW	ESQPQSGNKN	FYSGDPKNPK	SSIIYPTEWN	
JIM8232	AFKGVFLRNY	TDLVASVYAA	DDTERTNPLW	ESQPQSGNKN	FYSGDPKNPK	SSIIYPTEWN	
CNRZ385	VFKGVFLRNY	TDLVASVYAA	DDTERTNPLW	ESQPQSGNKN	FYSGDPKNPK	SSIIYPTEWN	
4F44	VFKGVFLRNY	TDLVASVYAA	DDTERTNPLW	ESQPQSGNKN	FYSGDPKNPK	SSIIYPTEWN	
<i>S. suis</i>	AFKGVFLRNY	TDLVASVYAA	DDTERTNPLW	ESQPQSGNKN	FYSGDPKNPK	SSIIYPTEWN	
	.:*****	*****	*****	*****:	** :***:*****	*****	

	961	970	980	990	1000	1010	1020
LMD-9	GTDSEGNALA	DGKYQYVLTY	SSEVPGAAVQ	TMIFDVIIDR	ESPVITTATY	DETNFTFNPR	
JIM8232	GTDSEGNALA	DGKYQYVLTY	SSEVPGAAVQ	TMIFDVIIDR	ESPVITTATY	DETNFTFNPR	
CNRZ385	GTDSGNALA	DGKYQYVLTY	SSKVPGAAVQ	TMIFDVIIDR	ESPVITTATY	DETNFTFNPR	
4F44	GTDSEGNALA	DGKYQYVLTY	SSEVPGAAVQ	TMIFDVIIDR	ESPVITTATY	DETNFTFNPR	
<i>S. suis</i>	GTDSEGNALA	DGKYQYVLTY	SSEVPGAAVQ	TMIFDVIIDR	ESPVITTATY	DETNFTFNPR	
	:**	*****	** :*****	*****	*****	*****	

	1021	1030	1040	1050	1060	1070	1080
LMD-9	PAIEKGESGL	YREQVFYLV	DASGVTTIPS	LLENGDVTVS	DNKVFVAQND	DGSFTLPLDL	
JIM8232	PAIEKGESGL	YREQVFYLV	DASGVTTIPS	LLENGDVTVS	DNKVFVAQND	DGSFTLPLDL	
CNRZ385	PAIEKGESGL	YREQVFYLV	DASGVTTIPS	LLKNGDVTVS	DNKVFVAQND	DGSFTLPLDL	
4F44	PAIEKGESGL	YREQVFYLV	DASGVTTIPS	LLKNGDVTVS	DNKVFVAQND	DGSFTLPLDL	
<i>S. suis</i>	PAIEKGESGL	YREQVFYLV	DASGVTTIPS	LLENGDVTVS	DNKVFVAQND	DGSFTLPLDL	
	*****	*****	*****	** :*****	*****	*****	

Domaine H



	1081	1090	1000	1110	1120	1130	1140
LMD-9	ADISKFYTV	EDYAGNISYE	KVENLISIGN	EKGLVTVNIL	DKDTNSPVPI	LFSYSVTDET	
JIM8232	ADISKFYTV	EDYAGNISYE	KVENLISIGN	EKGLVTVNIL	DKDTNSPVPI	LFSYSVTDEI	
CNRZ385	ADISKFYTV	EDYAGNISYE	KVENLISIGN	EKGLVTVNIL	DKDTNSPVPI	LFSYSVTDET	
4F44	ADISKFYTV	EDYAGNISYE	KVENLISIGN	EKGLVTVNIL	DKDTNSPVPI	LFSYSVTDET	
<i>S. suis</i>	ADISKFYTV	EDYAGNISYE	KVENLISIGN	EKGLVTVNIL	DKDTNSPVPI	LFSYSVTDET	
	*****	*****	*****	*****	*****	*****	

	1141	1150	1160	1170	1180	1190	1200
LMD-9	GKIVAELPRY	AGDTSVLKLP	FGTYTFDLFL	YDTEWSSLAG	ETKAVVTILE	DNSTAEVNFY	
JIM8232	GKIVAELPRY	AGDTSVLKLP	FGTYTFDLFL	YDTEWSSLAG	ETKAVVTISE	ENSTAEVNFY	
CNRZ385	GKIVAELPRY	AGDTSVLKLP	FGTYTFDLFL	YDTEWSSLAG	ETKAVVTILE	DNSTAEVNFY	
4F44	GKIVAELPRY	AGDTSVLKLP	FGTYTFDLFL	YDTEWSSLAG	ETKAVVTILE	DNSTAEVNFY	
<i>S. suis</i>	GKIVAELPRD	AGDTSVLKLP	FGTYTFDLFL	YDTEWSSLAG	ETKAVVTISE	ENSTAEVNFY	
	*****	*****	*****	****	*****	*****	* :*****

Résultats - Partie I

	1201	1211	1220	1230	1240	1250	1260
LMD-9	VTLKDKANLL	IDIDALLPSG	STIQLVTADG	QAIQLPNAKY	SKTDYGKFVP	VGTYTILPTL	
JIM8232	VTLKDKANLL	VIDIDALLPSG	STIQLVTADG	QTIQLPNAKY	SKTDYGKFVP	VGTYTILPTL	
CNRZ385	VTLKDKANLL	IDIDALLPSG	STIQLVTADG	QAIQLPNAKY	SKTDYGKFVP	VGTYTILPTL	
4F44	VTLKDKANLL	IDIDALLPSG	STIQLVTADG	QAIQLPNAKY	SKTDYGKFVP	VGTYTILPTL	
<i>S. suis</i>	VTLKDKANLL	VIDIDALLPSG	STIQLVTADG	QTIQLPNAKY	SKTDYGKFVP	VGTYTILPTL	
	*****	:*****	*****	*:*****	*****	*****	

	1261	1270	1280	1290	1300	1310	1320
LMD-9	PEGYEFLEEL	DVAVLANQSN	VKKLTLINKV	ALKELIAELA	GLEETARYYN	ASPELQTAYA	
JIM8232	PEGYEFLEEL	DVAVLANQSN	VKKLTLINKV	ALKKLI AELA	GLEETARYYN	ASPELQTAYA	
CNRZ385	PEGYEFLEEL	DVAVLANQSN	VKKLTLINKV	ALKELIAELA	GLEETARYYN	ASPELQTAYA	
4F44	PEGYEFLEEL	DVAVLANQSN	VKKLTLINKV	ALKELIAELA	GLEETARYYN	ASPELQTAYA	
<i>S. suis</i>	PEGYEFLEEL	DVAVLANQSN	VKKLTLINKV	ALKELIAELA	GLEETARYYN	ASPELQTAYA	
	*****	*****	*****	*****	*****	*****	

	1321	1330	1340	1350	1360	1370	1380
LMD-9	KALEDANAVY	ANKHNQAQVD	SALASLVAAR	EQLNGQATDK	EKLIAEVSNY	TPTQANFIYY	
JIM8232	KALEDANAVY	ANKHNQAQVD	STLASLVAAR	EQLNGQATDK	EKLIAEVSNY	TPTQANFIYF	
CNRZ385	KALEDANAVY	ANKHNQAQVD	SALASLVAAR	EQLNGQATDK	EKLIAEVSNY	TPTQANFIYY	
4F44	KALEDANAVY	ANKHNQAQVD	SALASLVAAR	EQLNGQATDK	EKLIAEVSNY	TPTQANFIYY	
<i>S. suis</i>	KALEDANAVY	ANKHNQVQVD	SALANLVAAR	EQLNGQATDK	EKLIAEVSNY	TPTQANFIYY	
	*****	*****	****.*****	*****	*****	*****	

	1381	1390	1400	1410	1420	1430	1440
LMD-9	NAENTKQIAY	DTAVRSAQLV	LNQENVTQAV	VNQALADLLA	AKANLDGQKT	DISALRSAVS	
JIM8232	NAENTKQIAY	DTAVRSAQLV	LNQENVTQAV	VNQALADLLA	AKAGLDGQKT	DISALRSAVS	
CNRZ385	NAENTKQIAY	DTAVRSAQLV	LNQENVTQAV	VNQALADLLA	AKANLDGQKT	DISALRSAVS	
4F44	NAENTKQIAY	DTAVRSAQLV	LNQENVTQAV	VNQALADLLA	AKANLDGQKT	DISALRSAVS	
<i>S. suis</i>	NAENTKQIAY	DTAVRSAQLV	LNQENVTQAV	VNQALADLLA	AKANLDGQKT	DISALRSAVS	
	*****	*****	*****	*****	*****	*****	

	1441	1450	1460	1470	1480	1490	1500
LMD-9	VSSVLKATDA	KYLNASENVK	QAYDQAVEEA	KAILVDESAS	QASVDQALAV	LTSAQAELDG	
JIM8232	VSSVLKATDA	KYLNASENVK	QAYDQAVEEA	KAILADESAS	QASVDQALAV	LTSAQAELDG	
CNRZ385	VSSVLKATDA	KYLNASENVK	QAYDQAVEEA	KAILVDESAS	QASVDQALAV	LTSAQAELDG	
4F44	VSSVLKATDA	KYLNASENVK	QAYDQAVEEA	KAILVDESAS	QASVDQALAV	LTSAQAELDG	
<i>S. suis</i>	VSSVLKATDA	KYLNASENVK	QAYDQAVEEA	KAILADESAS	QASVDQALAV	LTSAQAELNG	
	*****	*****	*****	****.*****	*****	*****	*****

Domaine W

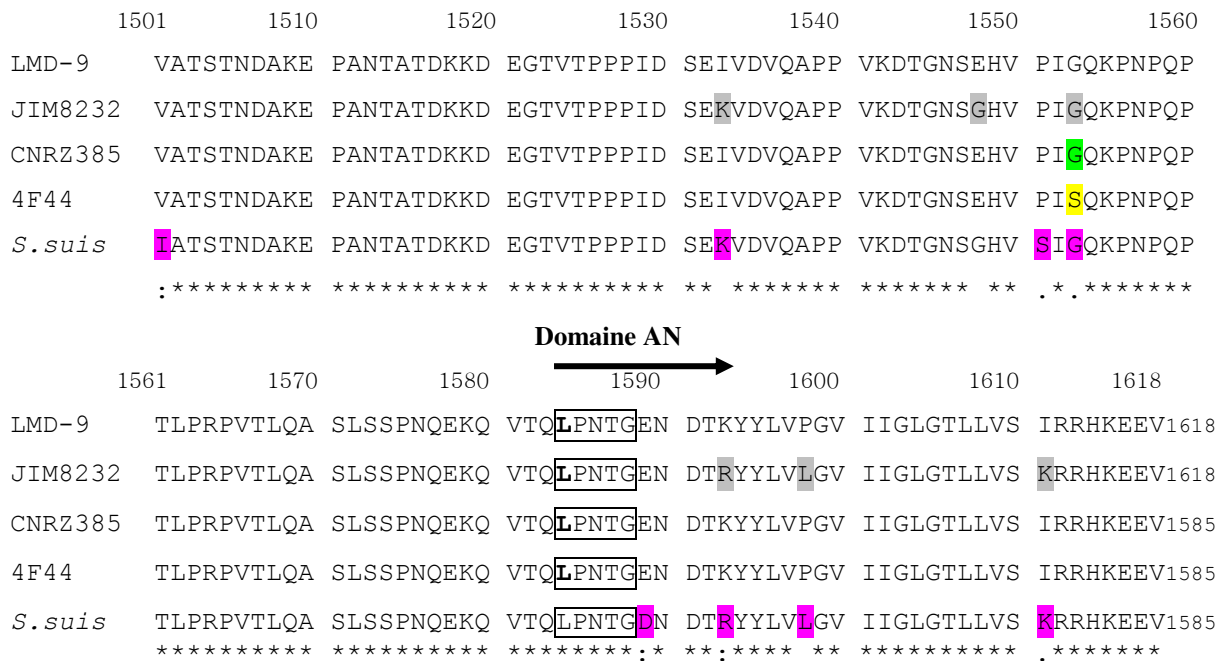


Figure 29. Alignement de la séquence protéique déduite du gène *prtS* de *Streptococcus thermophilus* 4F44 avec la séquence de protéases PrtS de différentes souches de *S. thermophilus* et de la protéase de *Streptococcus suis*.

Les séquences des gènes *prtS* des souches de *S. thermophilus* LMD-9 (GI:116627664), JIM8232 (GI:221047229), CNRZ385 (GI:9963932) et *S. suis* 89/1591 (GI:223897457) résultent de l'interrogation des banques de données (utilisation de BlastP).

Le début de chaque domaine de la protéase est indiqué par un caractère gras et par une flèche horizontale.

Les différences entre 4F44 et LMD-9 sont mentionnées en jaune.

Les différences entre 4F44 et JIM8232 sont mentionnées en gris.

Les différences entre 4F44 et CNRZ385 sont mentionnées en vert.

Les différences entre 4F44 et *S. suis* sont mentionnées en rose.

La triade catalytique est en rouge (D₂₀₅, H₂₇₁, S₆₀₀)

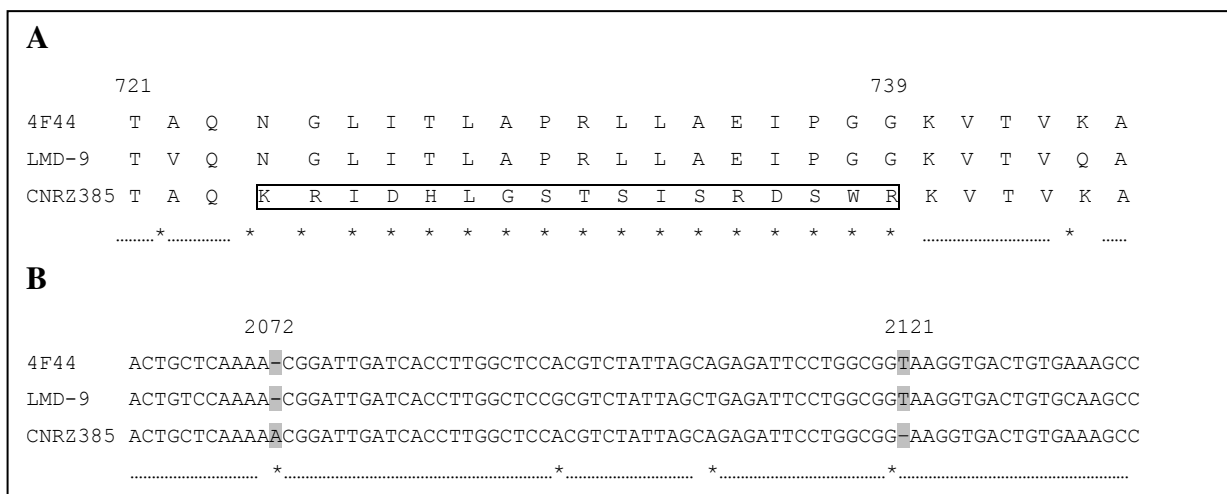


Figure 30. Alignement des séquences protéiques d'une portion du domaine A de PrtS (A) et des séquences nucléotidiques codant cette portion (B) chez *Streptococcus thermophilus* LMD-9 (GI:116100249), 4F44 (GI : 284080586) et CNRZ 385 (GI:9963931).

Deux décalages de lecture entraînent une séquence de 17 résidus différente (voir encadré) : addition d'une adénine à la position 2072 et perte d'une thymine en position 2121 dans l'allèle CNRZ385.

* mentionne les mutations

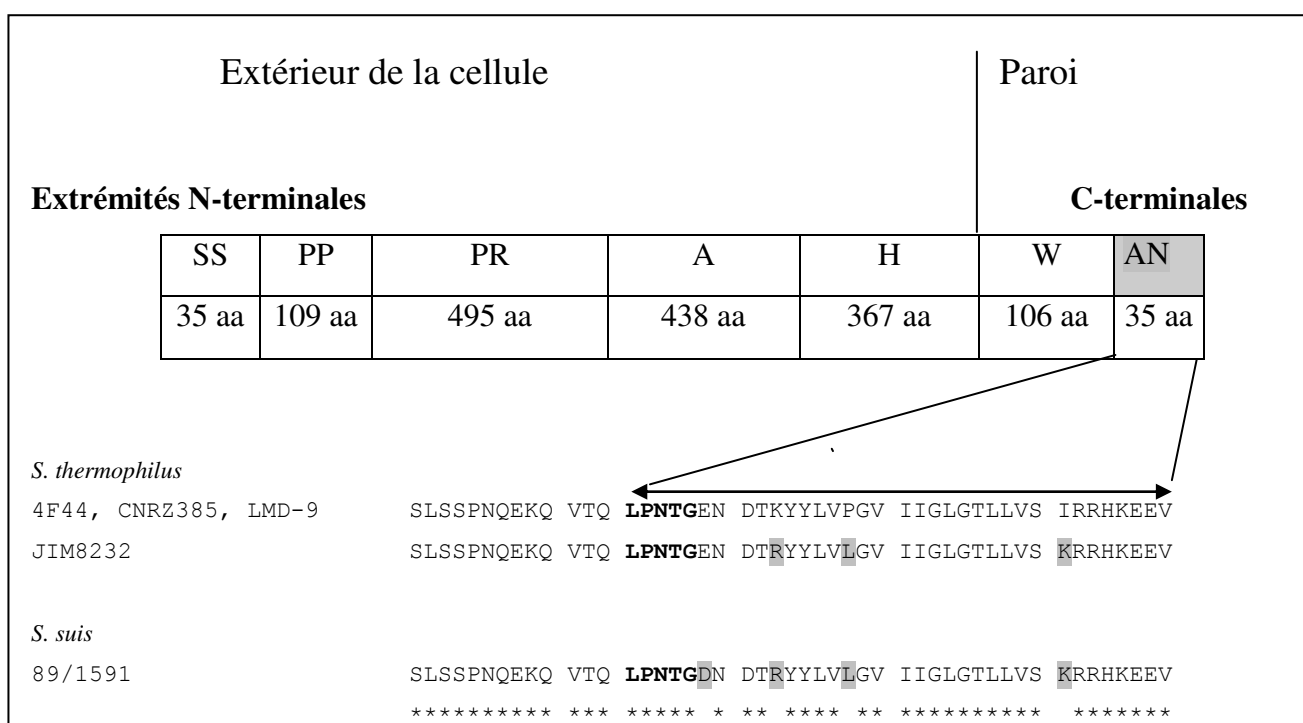


Figure 31. Comparaison du domaine d'ancrage de PrtS des souches de *Streptococcus thermophilus* 4F44, CNRZ 385, LMD-9 et JIM8232 et de *Streptococcus suis* 89/1591. Le motif d'ancrage LPNTG reconnu par SrtA est mentionné en gras. Les résidus surlignés sont ceux qui diffèrent de la séquence de 4F44.

Une identité parfaite est trouvée au niveau de ce domaine entre les séquences de PrtS des souches CNRZ385 et LMD-9. Dans le cas de la souche JIM8232, 3 substitutions sur les 35 résidus d'acides aminés ont été détectées ($K_{10} \rightarrow R_{10}$; $P_{15} \rightarrow L_{15}$; $I_{28} \rightarrow K_{28}$). Ces 3 substitutions sont également présentes dans le domaine d'ancrage de la protéase de *S. suis*. Une différence supplémentaire est à répertorier pour cette espèce : le résidu E_6 qui est retrouvé chez l'espèce *S. thermophilus* est remplacé par un résidu D_6 chez *S. suis*.

Ainsi, d'après la séquence déduite du gène (identique à celles des autres souches dont la protéase est ancrée), le domaine d'ancrage de la protéase de la souche 4F44 pourrait être la cible de la sortase A puisqu'il est intact.

3.5. Proportion de l'activité PrtS libre et ancrée chez *S. thermophilus* 4F44

La protéase PrtS de *S. thermophilus* 4F44 ayant été retrouvée à la fois libre et ancrée à la paroi, la part de l'activité protéasique de chaque forme a été recherchée. Cette quantification, à l'aide du substrat Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, a été réalisée avec les bactéries dans le milieu, avec les bactéries seules ou avec le milieu seul. Ainsi, 60% de l'activité protéasique de type PrtS (forme ancrée) sont retrouvées avec les bactéries seules et 40% dans le milieu seul (forme libre de PrtS).

Ainsi, pour expliquer la libération partielle de cette protéase, plusieurs hypothèses peuvent être proposées :

- la sortase SrtA qui permet l'ancrage à la paroi pourrait être déficiente ;
- la séquence de la protéase PrtS de 4F44, notamment au niveau du prodomaine, (absence de duplication) est différente des autres souches et, cette différence pourrait entraîner sa libération partielle ;
- la protéase PrtS de 4F44 (contrairement aux autres souches de *S. thermophilus*) pourrait avoir une activité auto-protéolytique, la libérant de son ancrage.

Quelle que soit l'hypothèse, il est important de vérifier la séquence du gène codant pour la sortase A et la séquence protéique C-terminale de la protéase PrtS.

Partie II

Recherche des causes de la libération de la protéase PrtS de *Streptococcus thermophilus*

4F44

1. Vérification de l'efficacité de la sortase A chez différentes souches de

S. thermophilus

Chez de nombreux streptocoques dont *S. thermophilus*, les protéines ayant un motif LPXTG en région C-terminale sont ancrées à la paroi cellulaire par établissement d'une liaison covalente avec le peptidoglycane. Cet ancrage est assuré par la sortase SrtA grâce à sa double activité endopeptidasique et transpeptidasique. Par homologie aux autres espèces de streptocoques (Comfort et Clubb, 2004), SrtA pourrait être responsable de l'ancrage de PrtS à la paroi puisque cette protéase comporte un motif LPXTG, LPNTG dans ce cas (Fernandez-Espla *et al.*, 2000). En outre, des traitements divers (chimique, mécanique et enzymatique) ont été nécessaires pour libérer la protéase des débris cellulaires de la souche CNRZ 385 (Shahbal *et al.*, 1993; Fernandez-Espla *et al.*, 2000).

Le domaine d'ancrage de la protéase PrtS de la souche 4F44 étant identique à celui des protéases PrtS des souches CNRZ385 et LMD-9 qui sont ancrées à la paroi cellulaire, la libération de PrtS dans le milieu extracellulaire de la souche 4F44 ne résulte donc pas d'une mutation dans ce motif entraînant sa non reconnaissance par SrtA .

1.1. Détermination de la séquence du gène *srtA* chez différentes souches de *S. thermophilus*.

Afin de déterminer si la libération de PrtS de la souche 4F44 dans le milieu extracellulaire résulte d'une déficience de la sortase SrtA, le gène *srtA* a été amplifié par PCR en utilisant deux couples d'amorces (Figure 32). Ces amorces ont permis d'obtenir deux produits de PCR de 583 et 647 pb, chevauchants, qui ont ensuite été séquencés. Les deux séquences ont alors été assemblées en contig. Une séquence de 976 nt a été ainsi obtenue (Figure 33). La comparaison de la séquence obtenue avec celle de LMD-9 présente 100% de recouvrement, l'organisation génétique de ce contig est la suivante : le gène codant SrtA flanqué en amont d'une portion du gène codant la gyrase A et en aval d'une portion du gène codant la lactoylglutathione lyase. Cette organisation est classique, elle est retrouvée pour l'ensemble des souches de *S. thermophilus* dont le génome est entièrement séquencé (LMD-9, NDO3, LMG18311, et CNRZ1066), mais aussi rencontrée chez de nombreux streptocoques (*S. mutans*, *S. pyogenes*, *S. equi* subsp. *zooepidemicus*, *S. suis*, *S. sanguinis*, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, *S. uberis* et *S. pneumoniae*) (Maruyama *et al.*, 2009 ; Beres *et al.*, 2002 ; Beres *et al.*, 2008 ; Holden *et al.*, 2009 ; Xu *et al.*, 2007 ; Shimomura *et al.*, 2011 ; Ward *et al.*, 2009 ; Lanie *et al.*, 2007).

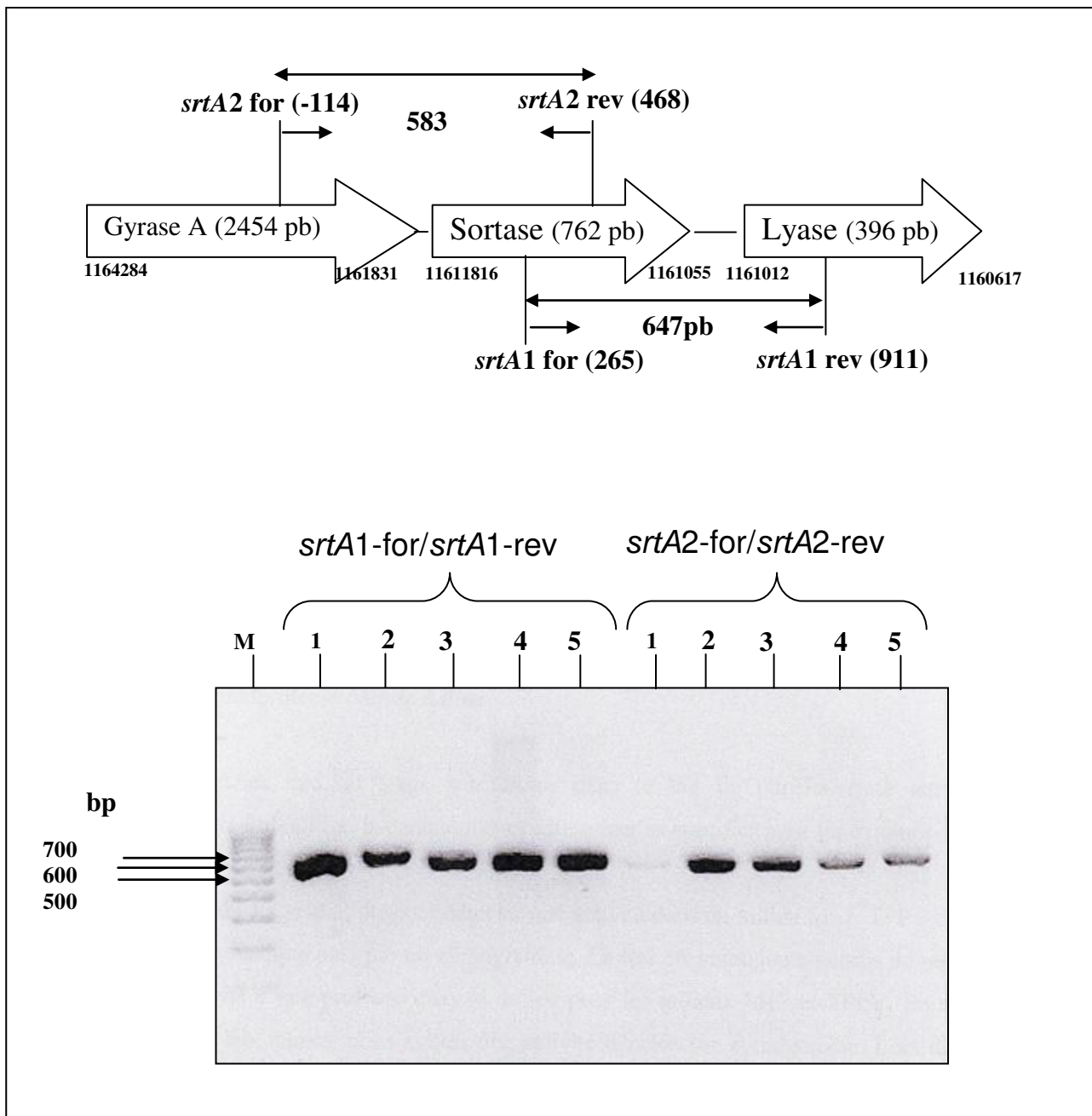


Figure 32. Gel d'électrophorèse en agarose des produits amplifiés par PCR pour le séquençage du gène *srtA* chez cinq souches de *Streptococcus thermophilus* (1 : PB18O, 2 : PB302, 3 : CNRZ307, 4 : 4F44, 5 : LMD-9).

Les deux couples d'amorces sélectionnés pour amplifier le gène *srtA* sont : *srtA1*-for : CCCAGATGGGTTCTCAAAA, *srtA1*-rev : CGGACGGTGATTTTCACGTA et *srtA2*-for : TCAAGGGGTTAAGGTCATGC, *srtA2*-rev : TATCAGAAGCCCCAGCGATA.

Lyase : Lactoylglutathione lyase

```

GATGATACTGCTCGTATTGTCACCTTTGCTTTGGTTGAACCTGAAGAAATTGATTAAGTTAC

      RBS      Codon Start
TGAAGACCAATAAAGTGGTGATAACTAATGAGAAAAGATAACAAAAATAATACCCCTAAAAAGCATC
GTAAGTGGCTTGAGGTCCTTCGTTGGATCTTGATTGTTGTTCTCTTGGTTGTTGGTTTAGCTTTAAT
TTTTAATAAATCAATTCGAAACACTATAATTGCTTGAATACTAATAAATATCAAGTAAGTAAGGTT
TCTAAAAAGACAATAAAGAAAAACAAGGAAGCTAGGGCAAGTTATGACTTTGATACGGTTAAATCTG
TTAGTACAGAGTCAGTCTTGCAAGCCCAGATGGGTTCTCAAAAACCTCCAGTTGTTGGTGGAAATTGC
TATCCCTGAGGTTGGTATTAATCTCCCTATTTTCAAAGGACTTGGTAATACAGAGCTTACCTATGGT
GCTGGAACATATGAAGGAAAATCAAGTCATGGGTGGGGAAAATAATTATTCATTGGCTAGTCACCACA
TTTTCGGTATCGCTGGGGCTTCTGATATGCTCTTCTCACCAATAGATAGAGCAAAAAATGGCATGAA
GATTTATCTTACGGATAAAAATAAGGTCTACACCTATGTTATCAGTGAGGTAAAAATTGTCCAACCA
ACTGAAGTAGCAGTGGTTGATGACACTCCTGGTAAATCTGAAGTGACTTTGGTAACTTGTACAGATG
CTGAAGCAACTCAGCGTACAGTTGTCAAAGGGAACCTGGAATCGCAGGTAGACTTTGACAAGGCAAG
TTCAGAT

                                Codon stop
ATTCTTGAAGACTTTAATAAGTCATACAATCAATTTCAAAGTTAAAGAAAAGGCCGTAAGGTCTTTTT
CTATGGAGGGAAAAAATGTTTTTGGAAACAATACATCATGTCGCTATCATTGTTTCTGATTCTGATC
TATCTCGAGATTTTTTATGTTAATAAACTAGGTCTTG
    
```

Figure 33. Séquence nucléotidique obtenue après séquençage contenant le gène *srtA* de *Streptococcus thermophilus* 4F44 (GI:284080588).

Les codons d'initiation (Start : ATG) et de fin (Stop : TAA) de traduction sont encadrés. Le site de fixation du ribosome (RBS) est souligné.

Cette séquence comporte une ORF de 759 nucléotides codant pour SrtA, une région amont de 89 nt et une région avale de 125 nt. L'analyse des séquences du gène montre un site potentiel de fixation du ribosome (RBS) localisé en amont du codon start ATG. Par contre, le ou les promoteur(s) n'ont pas été formellement identifiés. Le gène *srtA* doit faire partie du même opéron que le gène codant la gyrase se trouvant en amont. L'allèle *srtA* de la souche 4F44 est identique à 97% à celui de la souche LMD-9. Nous avons également déterminé la séquence du gène *srtA* d'autres souches PB302, PB180 et CNRZ307. Les trois séquences protéiques, déduites des séquences nucléotidiques

obtenues, présentent 100% d'identité avec celle de LMD-9. La souche CNRZ307 ne possède pas le gène *prtS*. Les deux autres le possèdent mais PB180 l'exprime très peu par rapport à la souche PB302. Pour ces deux souches, seule la forme ancrée de PrtS a été trouvée. Chez *S. thermophilus*, l'absence de SrtA ne semble pas létale, puisque le gène est interrompu pour les souches LMG18311 (GI:55821283) et CNRZ1066 (GI:55823196), de plus ces deux souches ne possèdent pas le gène codant la protéase PrtS.

1.2. Comparaison de séquences protéiques SrtA de diverses souches de *S. thermophilus*.

La séquence protéique déduite du gène *srtA* de *S. thermophilus* 4F44 composée de 253 résidus d'acides aminés est 99% et 98% identique à celles des souches ND03 et LMD-9 respectivement. Nous proposons un alignement de séquences réalisé avec ces trois séquences protéiques SrtA (dont le génome est entièrement séquencé : LMD-9 et ND03) (Figure 34). Trois substitutions ont été répertoriées entre la séquence de SrtA de 4F44 et ND03 (D₄ → Y₄, N₈ → K₈, D₂₃₉ → N₂₃₉) et six entre la séquence de SrtA de 4F44 et LMD-9 (N₈ → K₈, R₁₀ → K₇₀, I₁₆₂ → L₁₆₂, V₁₇₉ → I₁₇₉, V₂₂₂ → I₂₂₂ et D₂₄₃ → A₂₄₃). Le génome de la souche ND03 ne présente pas de gène *prtS*. Cette souche ne pourra donc pas être utilisée pour déterminer si SrtA est déficiente tout comme chez la souche 4F44.

Pour ces trois souches, l'ensemble des résidus d'acides aminés reconnus comme essentiels à l'activité enzymatique est identique pour la triade catalytique (H₁₄₆, C₂₁₂ et R₂₂₀) et le site actif (G₁₁₈, K₁₃₀, S₁₄₂, A₁₄₄, T₂₁₁, A₂₁₇).

1.3. Comparaison de séquences protéiques SrtA de différentes souches de *S. thermophilus* et espèces de streptocoques.

Les pourcentages d'identité entre le gène *srtA* de différentes espèces de streptocoques et l'allèle de 4F44 sont compris entre 59 et 89%.

En figure 35, nous proposons un alignement multiple de séquences de SrtA des 3 séquences de *S. thermophilus* 4F44, NDO3 et LMD-9 et de 14 espèces différentes de streptocoques. Le pourcentage d'identité de ces séquences est compris entre 64 et 99%. La numérotation diffère du précédent alignement, en effet la séquence de référence est la séquence SrtA de *S. downei* qui a 5 résidus d'acides aminés supplémentaires en région N-terminale.

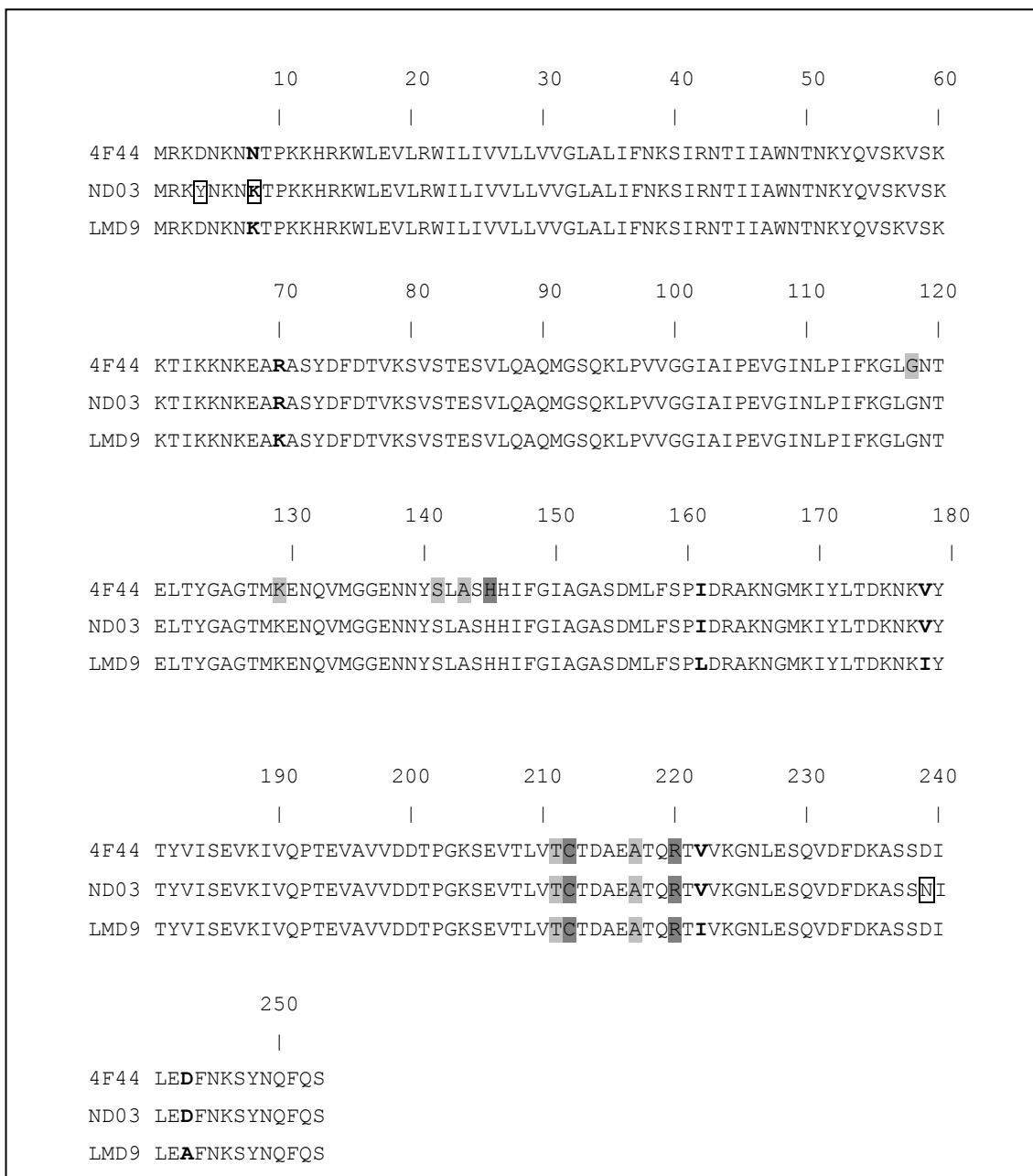


Figure 34. Alignement de la séquence de la sortase A SrtA de *Streptococcus thermophilus* 4F44 (gb ADB77873.1), ND03 (gb ABJ66440.1), LMD-9 (gb ADQ63270.1).

Les substitutions entre SrtA des souches 4F44 et LMD9 sont indiquées en caractères gras. Les substitutions entre SrtA des souches 4F44 et NDO3 sont encadrées. Les résidus correspondant au site actif sont surlignés en gris clair et ceux de la triade catalytique sont en gris foncé.

Résultats - Partie II

	10	20	30	40	50	60
	↓					
<i>S. th.</i> 4F44	----	MRKDNKNT	PKKHKRWLE	VLRWILIV	VLLVVGL	LALIFNKS
<i>S. th.</i> ND03	----	MRKYNKNT	PKKHKRWLE	VLRWILIV	VLLVVGL	LALIFNKS
<i>S. th.</i> LMD9	----	MRKDNKNT	PKKHKRWLE	VLRWILIV	VLLVVGL	LALIFNKS
<i>S. vestib.</i>	----	MRKDNKNT	PKKHKRWLE	VLRWILIV	VLLVVGL	LALIFNKS
<i>S. salivarius</i>	----	MSKDKNK	KATKRRR	KWLDILR	WLVVLL	VVGLALIF
<i>S. downei</i>		MKRTSSR	NSKGRKE	KESSKK	KKHHW	LRTILVL
<i>S. sobrinus</i>		MKKAQSR	QSDFR	TRKDS	SKKKH	HWFRTIL
<i>S. criceti</i>		MKTAKSR	QSDHR	KKRDS	SKKKH	HWFRTIL
<i>S. agalactiae</i>	-----	MRNKKL	HGGFNF	VVRWLL	VLLIIV	GLALVF
<i>S. pyogenes</i>	-----	MVKKQK	RKRKIS	SM-SW	ARKLLI	AVLLIL
<i>S. dysgal.</i>	-----	MVKKQRR	QSRKTM	-SWAR	KILVA	VLLIL
<i>S. equi</i>	-----	M-SFAR	GILV	VLLLI	IIGL	LALFNK
<i>S. uberis</i>	-----	MAESRR	RKKGK	STFS	DKLRS	FVAVIL
<i>S. mutans</i>	-----	MKKERQ	SRKRS	SFLRT	FLPIL	LLVIG
<i>S. ferus</i>	-----	MKRSQ	KNVKK	RRWIA	NSFFL	LVVGL
<i>S. gallolyticus</i>	-----	MQKHNL	IKLLK	GLLV	LLLI	IGVALI
<i>S. suis</i>	-----	MSKREN	KKRKG	SFWR	NLLTV	VLLIL
				*	* * * *	* * * * *

	70	80	90	100	110	120
	↓					
<i>S. th.</i> 4F44	SKVSKKTI	KKNEAR	ASYDFD	TVKSV	STESVL	QAQMG
<i>S. th.</i> ND03	SKVSKKTI	KKNEAR	ASYDFD	TVKSV	STESVL	QAQMG
<i>S. th.</i> LMD9	SKVSKKTI	KKNEAK	ASYDFD	TVKSV	STESVL	QAQMG
<i>S. vestib.</i>	SKVSKKTI	EKNKEA	EASYDF	TVKSV	STESVL	QAQIGA
<i>S. salivarius</i>	SKVSKKTI	EKNKEA	KTSFDF	TVKSIS	TESVL	QAQMDA
<i>S. downei</i>	SKVDKKT	LTKNK	KAKVNY	DFDSV	KISAQ	SVISSQ
<i>S. sobrinus</i>	SKVDKKT	LTKNK	KAKVNY	DFDSV	KSVSA	QSVISSQ
<i>S. criceti</i>	SKVDEKT	LKKNK	KAKVNY	DFDSV	SVSAQ	SVISSQ
<i>S. agalactiae</i>	SRVSKKT	IEKNK	SKTSY	DFSSV	KSISTE	SILSAQ
<i>S. pyogenes</i>	TKVSKKQI	KKNEAK	STFDF	QAVEP	VSTESV	LQAQMA
<i>S. dysgal.</i>	TKVSKKEI	KKNEK	VKSTF	DFQAVE	PVSTE	AVLQAQ
<i>S. equi</i>	TKVSKKTI	KKNEAK	SSFDF	QAVQP	VSTESV	LQAQMD
<i>S. uberis</i>	QHVTKDT	IQKNKE	ADSSF	DFSAV	QAVST	DTVLKA
<i>S. mutans</i>	SNVSKKD	IEHNK	AAHSS	FDKVES	ISTQS	VLAAQ
<i>S. ferus</i>	SNVSKKD	IDKNK	SAKTSY	DFDKV	ESISTE	KVLAAQ
<i>S. gallolyticus</i>	SQVSKQT	IEQNK	DANVSY	DFDSV	ESISTE	SVLKAQ
<i>S. suis</i>	SNVTTED	IEKNK	QAETTF	DFDQV	QSISTE	AILAAQ
	*	* *	* * *	* *	* *	* * * * *

Résultats - Partie II

	130	140	150	160	170	180
					↓	
<i>S. th.</i> 4F44	GLGNTE	TYGAGT	MKENQVM	GGENNYSLASHH	IFGIAGASDMLFSP	I DRAKNGMKIYLT
<i>S. th.</i> ND03	GLGNTE	TYGAGT	MKENQVM	GGENNYSLASHH	IFGIAGASDMLFSP	I DRAKNGMKIYLT
<i>S. th.</i> LMD9	GLGNTE	TYGAGT	MKENQVM	GGENNYSLASHH	IFGIAGASDMLFSP	L DRAKNGMKIYLT
<i>S. vestib.</i>	GLGNTE	TYGAGT	MKENQVM	GGENNYSLASHH	VFGIAGASDMLFSP	LDKAKEGMIYLT
<i>S. salivarius</i>	GLGNTE	TYGAGT	MKEDQVM	GGENNYSLASHH	VFGIAGASDMLFSP	LDKAKEGMIYLT
<i>S. downei</i>	GLGNTE	LSYGAGT	MKESQVM	GGENNYALASHH	VFGVNGASKMLFSP	LENAKNGMEIYLT
<i>S. sobrinus</i>	GLGNTE	LSYGAGT	MKENQVM	GGTNNYALASHH	VFGVNGASKMLFSP	LDNAKNGMEIYLT
<i>S. criceti</i>	GLGNTE	LSYGAGT	MKENQVM	GGENNYALASHH	VFGVTGASKMLFSP	LDHAKNGMDIYLT
<i>S. agalactiae</i>	GLGNTE	LSYGAGT	MKENQIM	GGQNNYALASHH	VFGTGSKMLFSP	LEHAKKGMKVYLT
<i>S. pyogenes</i>	GLGNTE	LIYGAGT	MKEDQVM	GGENNYSLASHH	IFGITGSSQMLFSP	PLERAQNGMSIYLT
<i>S. dysgal.</i>	GLGNTE	LIYGAGT	MKEDQVM	GGENNYSLASHH	IFGITGSSQMLFSP	PLERAQKMSIYLT
<i>S. equi</i>	GLGNTE	LIYGAGT	MKEDQVM	GGENNYSLASHH	IFGLTGSSQMLFSP	PLERAQKMSIYLT
<i>S. uberis</i>	GLGNTE	LIYGAGT	MKENQVM	GGDNNYSLASHH	IFGMAGSSQMLFSP	PLERAKVGMAYVTD
<i>S. mutans</i>	GLDNV	GLTYGAGT	MKNDQVM	G-ENNYALASHH	VFGMTGSSQMLFSP	PLERAQKGEIYLT
<i>S. ferus</i>	GLDNAG	LYYGAGT	MKENQVM	G-ENNYALASHH	VFGMTGSSQMLFSP	PLERAKAGMKIYLT
<i>S. gallolyticus</i>	GLGNTE	TYGAGT	MKENQVM	G-SGNYALASHH	VFGTGSQMLFSP	LENVKTGMKIYLT
<i>S. suis</i>	GVFNTE	SLMYGAGT	MKENQEM	G-KGNYALASHH	IFGVTGAADVLFSP	LDRAKNGMKIYITD
	* * *	*****	* **	** *****	** *	****
	190	200	210	220	230	240
	↓					
		.	.	.	↓	.
<i>S. th.</i> 4F44	KNK V YTYVISEVKI	VQPT E VAV	VDDTPGKSEVTL	VTCTDAEATQ R	T VVKG N LESQVDFDK	
<i>S. th.</i> ND03	KNK V YTYVISEVKI	VQPT E VAV	VDDTPGKSEVTL	VTCTDAEATQ R	T VVKG N LESQVDFDK	
<i>S. th.</i> LMD9	KNK I YTYVISEVKI	VQPT E VAV	VDDTPGKSEVTL	VTCTDAEATQ R	T IVKG N LESQVDFDK	
<i>S. vestib.</i>	KNKVYTYVISEVKI	VQPT E VAV	VDDTPGKSEVTL	VTCTDAEATQ R	T IVKG E LKSQVDFDK	
<i>S. salivarius</i>	KNKVYTYVISEVKV	VQPT E VAV	VDDTPGKSEVTL	VTCTDAEATQ R	T IVKG E LKSQVDFDK	
<i>S. downei</i>	KNKVYTYIIEVKT	VEPSD V AVI	DDTPGAKNLT	LVTCDDAEAT R	I IVS A NYKEEVSYDK	
<i>S. sobrinus</i>	KNKIYTYTISEVKT	VNPSD V AVI	DDTPGAKNLT	LVTCDDAEASH R	I IVS A NYKDEVSYDK	
<i>S. criceti</i>	KNKVYTYVITEVKT	VDP S D V AVI	DDTPGAKNLT	LVTCDDAEASH R	I IVS A NYKQEVAYDK	
<i>S. agalactiae</i>	KSKVYTYTITEISK	VTPEH V EVI	DDTPGKSQLT	LVTCDDPEATE R	I IVH A ELEKTGEFST	
<i>S. pyogenes</i>	KEKIY E YI I KDVFT	V A PER V D V I	DDTAGLKEVTL	VTCTDIEATE R	I IVKG E LKTEYDFDK	
<i>S. dysgal.</i>	KEKIY E YTIKDVFT	V A PER V D V I	DDTAGLKEVTL	VTCTDIEATE R	I IVKG E LKTEYDFDK	
<i>S. equi</i>	K E RIY E YEINAVFT	V T PER I D V I	DDTPGLKEVTL	VTCTDYEATE R	I IVKG A IKNEYEFNK	
<i>S. uberis</i>	KEKIYHYDINSVQT	V T PR I D V I	DDTPGFKEITL	VTCTDAEATE R	I IVKG L LKEEMFN D	
<i>S. mutans</i>	KNKVYTYVISEVKT	V T PEH V EVI	DDNRPQNEVTL	VTCTDAGAT A R T	I IVH G TYKGETDFNK	
<i>S. ferus</i>	KNKIYTYVITQVQT	VEPEH V EVI	DDDEPGKTEITL	VTCTDAEAT A R T	I IVH G TYEGEV S FSK	
<i>S. gallolyticus</i>	K E TVYTYIVTSIES	V A PS V AVI	DDTE-ETE	VTCTDAEAT S R T	I IVKG V YDSEV S FDQ	
<i>S. suis</i>	KTNVYTYVIDSVEI	V S PE S V V I	DDVEGRTEVTL	VTCTDYNAT Q R I	I IVKG V LEST P YNE	
	* *	*	*	*****	* * *	*

		250	260	
		↓		% identité avec SrtA de 4F44
<i>S. th.</i>	4F44	ASSDILE [*] DFNKSYNQFQS--		100%
<i>S. th.</i>	ND03	ASSNILE [*] DFNKSYNQFQS--		99%
<i>S. th.</i>	LMD9	ASSDILE [*] AFNKSYNQFQS--		98%
<i>S. vestib.</i>		ASSDIIIEAFNKSYNQFQS--		94%
<i>S. salivarius</i>		ASSDIIIEAFNKSYNQFQS--		88%
<i>S. downei</i>		ASQKMIEAFNRSYNQLSL--		69%
<i>S. sobrinus</i>		ASQKMIDAFNRSYNQLSL--		67%
<i>S. criceti</i>		ASQKMLDAFNRSYNQLSM--		70%
<i>S. agalactiae</i>		ADESILKAFSKYNQINL--		64%
<i>S. pyogenes</i>		APADV [*] LKAFNHSYNQVST--		69%
<i>S. dysgal.</i>		APADV [*] LKAFNHSYNQVST--		68%
<i>S. equi</i>		APDDV [*] LKAFNHSYNQMST--		70%
<i>S. uberis</i>		APKKVLNAFNHSYNQVAIE-		67%
<i>S. mutans</i>		TSKKIKKAFRQSYNQISF--		66%
<i>S. ferus</i>		ASKTVKKA [*] FRQTYNQMQQL--		66%
<i>S. gallolyticus</i>		APEDILD [*] AFNTAYNQIAL--		71%
<i>S. suis</i>		TAKDILDSFNKSYNQYDYGQ		64%

Figure 35. Alignements de séquences de la sortase A SrtA de *Streptococcus thermophilus* 4F44 (gb ADB77873.1), *S. thermophilus* ND03 (gb ABJ66440.1), *S. thermophilus* LMD-9 (gb ADQ63270.1), *S. vestibularis* F0396 (gb EFQ59413.1), *S. salivarius* SK126 (gb EEK09930.1), *S. downei* (gb EFQ57397.1), *S. pyogenes* NZ131 (gb ACI61212.1), *S. agalactiae* NEM316 (gb EAO71811.1), *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* GGS_124 (YP_002996626.1), *S. equi* subsp. *equi* 4047 (YP_002746474.1), *S. sobrinus* (dbj BAG82878.1), *S. mutans* NN2025 (YP_003484846.1), *S. gallolyticus* UCN34 (YP_003429737.1), *S. ferus* (dbjBAI50581.1), *S. suis* (dbjBAC56211.1), *S. criceti* (dbjBAI50579.1) et *S. uberis* 0140J (YP_002562210.1).

La numérotation des résidus est faite par rapport à *S. downei*. La séquence SrtA de *S. pyogenes* encadrée est prise comme référence pour montrer les résidus importants pour la reconnaissance du motif LPXTG (Race *et al.*, 2009). Ces résidus sont situés au-dessus des alignements par un point et sont surlignés dans les différentes séquences quand ils sont conservés. Les signes * situés en dessous des alignements indiquent les résidus d'acides aminés qui sont identiques. Les substitutions entre la séquence 4F44 et LMD-9 sont mentionnées par une flèche descendante.

Parmi les substitutions rencontrées entre SrtA de la souche 4F44 et LMD-9 trois résidus : L₁₆₇, I₂₂₇, et A₂₄₈ sont très conservés au sein du genre streptocoque, ainsi ils sont retrouvés pour la souche LMD9 et chez quasiment toutes les espèces présentées, et ils sont remplacés chez la 4F44 par I₁₆₇, V₂₂₇, et D₂₄₈. Chez *S. pyogenes*, Race *et al.* (2009) mettent en évidence l'importance de huit résidus d'acides aminés pour bien orienter le motif LPXTG de la protéine à ancrer dans le site actif de SrtA. Ces résidus (numérotés sur la figure 35 par rapport à *S. downei*) sont M₁₃₄, V₁₉₅, V₂₀₀, V₂₀₂, V₂₀₃, V₂₁₅, R₂₂₅, I₂₂₇. Les alignements de séquences montrent que ces résidus sont bien conservés. Parmi ces résidus, chez *S. thermophilus* LMD-9 (dont la protéase PrtS est bien ancrée), 7 résidus sont retrouvés identiques à ceux de *S. pyogenes* M₁₃₄, I₁₉₅, V₂₀₀, V₂₀₂, V₂₁₅, R₂₂₅, I₂₂₇, seul V₂₀₃ est substitué par I₂₀₃. Cette substitution est retrouvée chez les deux autres souches de *S. thermophilus* (4F44 et ND03) mais aussi chez *S. salivarius* et *S. vestibularis* (espèces du groupe *salivarius*). Chez *S. thermophilus* 4F44 parmi ces résidus d'acides aminés, le résidu I₂₂₇ est substitué en V₂₂₇, il est différent chez *S. pyogenes*, *S. thermophilus* LMD-9 et chez toutes les autres espèces représentées dans la figure 35.

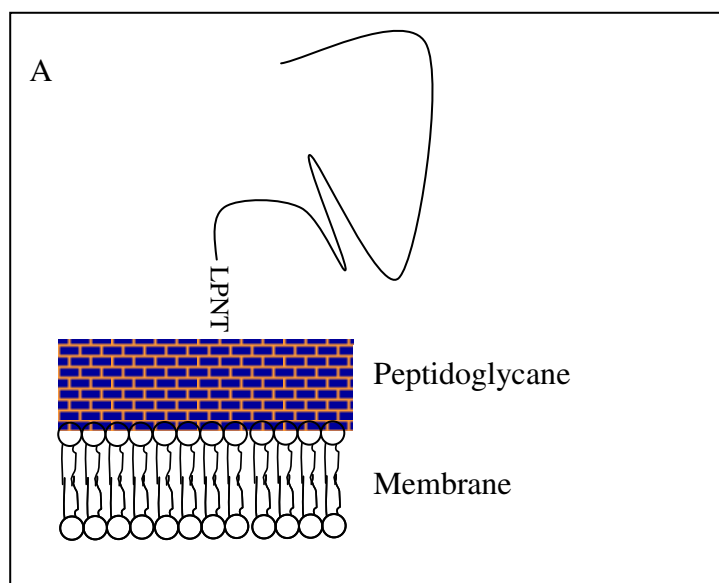
2. Mise en évidence de la séquence consensus du domaine d'ancrage dans la région C-terminale de la protéine PrtS libre

La sortase A de la souche 4F44 diffère de six résidus d'acides aminés par rapport à celle de la souche LMD-9 et notamment au niveau du résidu I₂₂₂ (Figure 34). Ce résidu (numéroté 227 en figure 35) a été décrit chez *S. pyogenes* comme important pour bien positionner le motif LPXTG afin qu'il subisse correctement l'activité endopeptidasique (Race *et al.*, 2009). SrtA de la souche 4F44 pourrait donc être partiellement défectueuse pour l'activité endopeptidasique.

La protéase pourrait ainsi se retrouver sous différentes formes, ancrée (Figure 36 A) et libre avec une extrémité C-terminale intacte (Figure 36 B) ou ayant subi uniquement l'activité endopeptidasique de la sortase (Figure 36 C).

Dans le but de déterminer la séquence protéique de PrtS, les 2 bandes protéiques de PrtS libre de masse moléculaire apparente de 170 kDa et de 154 kDa (identifiées précédemment par micro-séquençage d'Edman), ont subi une hydrolyse trypsique. Deux types de spectromètres de masse ont été utilisés pour caractériser les fragments peptidiques générés.

Forme ancrée



Forme libre

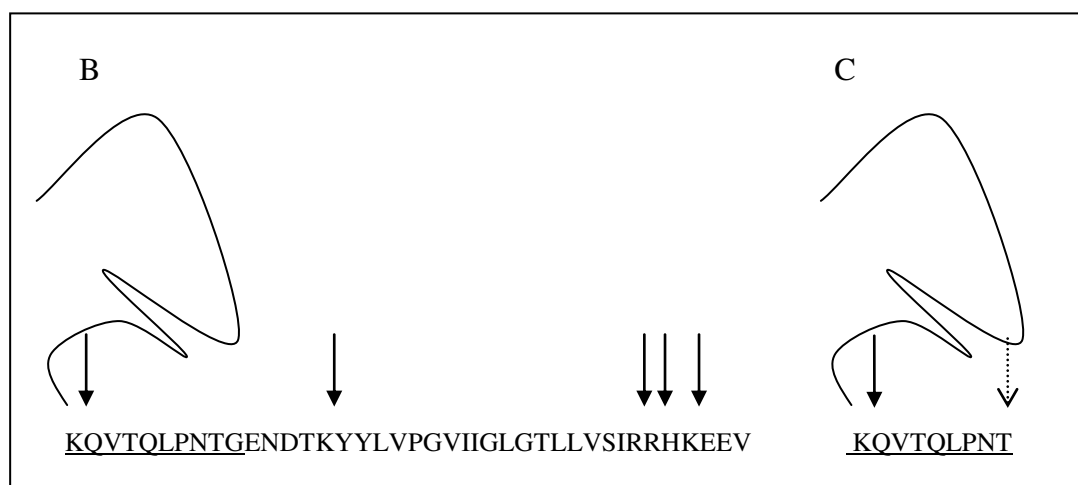


Figure 36. Représentation schématique des localisations et séquences C-terminales hypothétiques de la protéase PrtS chez *Streptococcus thermophilus* 4F44.

A. Protéase PrtS liée au peptidoglycane

B. Protéase PrtS libre avec extrémité C-terminale intacte

C. Protéase PrtS libre avec extrémité C-terminale ayant subi uniquement l'activité endopeptidasique de la sortase A

Les flèches → représentent les sites de coupure tryptiques. La flèche ...> représente l'activité endopeptidasique de la sortase A.

2.1. Détermination des masses des peptides tryptiques de PrtS par spectrométrie MALDI-TOF

Les différents peptides tryptiques identifiés correspondent à la séquence de la protéase PrtS déduite de la séquence codante du gène de la souche 4F44 (GI:284080587). Le taux de recouvrement de la protéine PrtS non mature (1550 résidus d'aa) avec les peptides tryptiques analysés par MALDI TOF (Perkins *et al.*, 1999) est de 33%, 41 peptides tryptiques sur 84 potentiellement analysables ont été caractérisés (Figure 37). Les peptides tryptiques potentiellement attendus (compatibles avec le seuil de détection et à condition que l'hydrolyse soit totale) issus de l'hydrolyse de l'extrémité C-terminale ($_{1512}\text{QVTQLPNTGENDTK}_{1525}$, $_{1526}\text{YYLVPGVIIGLGILLVSIR}_{1544}$) n'ont pas été détectés. Néanmoins lors de l'analyse, un peptide de masse de 797,4 Da a été détecté et d'après les masses théoriques attendues, ce peptide peut correspondre à deux peptides $_{1545}\text{RHKEEV}_{1550}$ et $_{1075}\text{IVAELPR}_{1081}$ de masses proches (797,4264 et 797,4879 Da respectivement). Le peptide $_{1545}\text{RHKEEV}_{1550}$ qui serait issu d'une hydrolyse tryptique incomplète pourrait être détecté. Le faible taux d'ionisation de ces deux peptides rend impossible l'analyse MS/MS, ce qui ne permet pas de conclure à la présence de ce peptide représentant l'extrémité C-terminale. De plus, un peptide chevauchant l'extrémité C-terminale du prodomaine et l'extrémité N-terminale de la protéase mature a été retrouvé, confirmant l'hypothèse que la protéase est libérée (au moins en partie) sous la forme non mature.

2.2 Détermination des masses des peptides tryptiques de PrtS par spectrométrie ESI-FT-ICR

Afin de contourner les problèmes techniques rencontrés (dûs à la composition de peptides recherchés très spécifiques) avec la spectrométrie MALDI-TOF, la spectrométrie de masse ESI-FT-ICR qui est une technique plus sensible que le MALDI-TOF a été utilisée. Cet appareillage "FT-ICR" de MS permet d'obtenir une résolution en masse très élevée, une grande précision et fiabilité des résultats par rapport aux autres appareillage de MS (par exemple TOF) (Yates *et al.*, 2009 ; Yates, 2004 ; Douglas *et al.*, 2005). Tous les peptides tryptiques obtenus ont été analysés par MS/MS. Avec cette technique ESI-FT-ICR, le taux de recouvrement est de 69% (Figure 38) au lieu de 33% en MALDI-TOF. De plus l'analyse, en ESI-FT-ICR MS/MS a permis de trouver deux peptides tryptiques ($_{1512}\text{QVTQLPNTGENDTK}_{1525}$ et $_{1512}\text{QVTQLPNTGENDTKYYLVPGVIIGLGILLVSIR}_{1545}$) issus de la région C-terminale de la protéine PrtS. La présence de ces 2 peptides contenant le motif LPNTG du domaine d'ancrage montre que l'activité de SrtA serait déficiente. Le premier peptide fait partie des peptides théoriques si l'hydrolyse est complète, par contre pour l'obtention du deuxième peptide l'hydrolyse tryptique est partielle, présentant deux mauvaises coupures (miscleavages).

1	DELTSLVETKVEATVPDAIVSESASESPVAEELVDTSVEATSTDVTTDNEEETPGSEAL	60
61	ENSANTEVETTQPAVETPAISEKKVEEEEKLSVADETTAITNQEEAKPQNIDSNTIITVLP	120
121	KVWYSGYKGEGETVVAIIDSGLDVDHDLVHISDLSTAKYKSEKEIEAAKEAAGITYGEWFN	180
181	DKVVFQYNYVDVNTVLKEEDKRSHGMHVTSIATGNPTQPVAGQLMYGVAPEAQVMFMRVF	240
241	SDLKATTGAALYVKAIEDAVKLGADSNLSLGGANGSVVMNENVTAIEAARRAGVSVV	300
301	IAAGNDGTFGSGHSNPSADYPDYGLVGAPSTAHDASVASYNNTTVGSKVINIIGLENN	360
361	DLNYGKSSFDNPEKSPVPFEIGKEYEYVYAGIGQASDFDGLDLTGKLLALIKRGTITFSEK	420
421	IANATAAGAVGVVIFNSRPGEANVSMQLDDTAIAIIPSVFIPLEFGEALAANSYKIAFNNE	480
481	TDIRPNPEAGLLSDFSSWGLSADGELKPDLAAPGGAIYAAINDNDYANMQGTSMASPHVA	540
541	GAAVLVKQYLLATYPTKSPQEI EALVKHLLMSTAKAHVNKETTAYTSRQQGAGIIDTAA	600
601	AISTGLYLTGEDGYGSITLGNVEDTFSFTVTLHNITNEDKTLNYSTQLTTDQAQNGLITL	660
661	APRLLAEIPGGKVTVKANSSTTVTINVDASSFAEELTGLMKNGYYLEGFVRFDTVADDDG	720
721	IVSIPYVGFGRGEFQNLAVLEEPIYNLIADGKGGFYFEPVTAQPNTVDISHHYTGLVTGST	780
781	ELIYSTDKRSDSAIKTLGTFKNKAGYFVLELDESQKPHLAISPNGDDNQDSLQVFKGVFLR	840
841	NYTDLVASVYAADDTERTNPLWESQPQSGNKNFYSGDPKNPKSSIIYPTEWNGTDSEGNA	900
901	LADGKYQYVLTYSSEVPGAAVQTMIFDVIIDRESPVITTATYDETNTFTFNPRPAIEKGES	960
961	GLYREQVFYLVADASGVTTIPSLKNGDVTVSDNKVFVAQNDDGSFTLPLDLADISKFY	1020
1021	TVEDYAGNISYEKVENLISIGNEKGLVTVNILDKDTNSPVPILFSYSVTDETGKIVAEELP	1080
1081	RYAGDTSVLKLPFGTYTFDLFLYDTERSSLAGETKAVVTILEDNSTAEVNFYVTLKDKAN	1140
1141	LLIDIDALLPSGSTIQLVTADGQAIQLPNAKYSKTDYQKFPVPGTYTILPTLPEGYEFLE	1200
1201	ELDVAVLANQSNVKKLTLINKVALKELIAELAGLEETARYYNASPELQTAYAKALEDANA	1260
1261	VYANKHNQAQVDSALASLVAAREQLNGQATDKEKLIAEVSNYTPPTQANFIYYNAENTKQI	1320
1321	AYDTAVRSAQLVLNQENVTOAVVNQALADLLAAKANLDGQKTDISALRSVSVSSVLKAT	1380
1381	DAKYLNASENVKQAYDQAVEAAKAILVDESASQASVDQALAVLTSQAELDGVATSTNDA	1440
1441	KEPANTATDKKDEGTVTPPPIDSEIVDVQAPPVKDTGNSEHVPI SQKPNPQPTLPRPVTL	1500
1501	QASLSSPNQEKQVTQLPNTGENDTKYLLVPGVIIIGLGTLLVSIRRHKEEV1550	

Figure 37. Recouvrement de la séquence de la protéine PrtS libre de *Streptococcus thermophilus* 4F44 (GI:284080587, sans le peptide signal) avec les peptides tryptiques identifiés par l'analyse MALDI-TOF MS présentant un mascot score supérieur à 30 (P<0,05) (logiciel MASCOT, Perkins *et al.*, 1999).

Les peptides tryptiques retrouvés sont grisés.

1	DELTSLVETKVEATVPDAIVSESASESPVAEELVDTSTVEATSTDVTTDNEEETPGSEAL	60
61	ENSANTEVETTQPAVETPAISEKKVEEEEEKLSVADETTAITNQEEAKPQNIDSNTIITVP	120
121	KVWYSGYKGEGETVVAIIDSGLDVDHDVHLHISDLSTAKYKSEKEIEAAKEAAGITYGEWFN	180
181	DKVVFGYNYVDVNTVLKEEDKRSHGMHVTSIATGNPTQPVAGQLMYGVAPEAQVMFMRVF	240
241	SDLKATTGAALYVKAIEDAVKLGADSLNLSLGGANGSVVNMNENVTAIEAARRAGVSVV	300
301	IAAGNDGTFGSGHSNPSADYPDYGLVGAPSTAHDIAISVASYNNTTVGSKVINIIGLENN	360
361	DLNYGKSSFDNPEKSPVPFEIGKEYEYVYAGIGQASDFDGLDLTGKLALIKRGTITFSEK	420
421	IANATAAGAVGVVIFNSRPGEANVSMQLDDTAIAIPSVFIPLEFGEALAANSYKIAFNNE	480
481	TDIRPNPEAGLLSDFSSWGLSADGELKPDLAAPGGAIYAAINDNDYANMQGTSMASPHVA	540
541	GAAVLVKQYLLATYPTKSPQIEALVKHLLMSTAKAHVNKETTAYTSRQAGIIDTAA	600
601	AISTGLYLTGEDGYGSITLGNVEDTFSFTVTLHNIITNEDKTLNYSTQLTTDQAQNGLITL	660
661	APRLLAEIPGGKVTVKANSSTTVTINVDASSFAEELTGLMKNGYYLEGFVRFDTVADDGD	720
721	IVSIPYVGRGEFQNLAVLEEPIYNLIADGKGGFYFEPVTAQPNTVDISHHYTGLVTGST	780
781	ELIYSTDKRSDSAIKTLGTFKNKAGYFVLELDESGKPHLAISPNGDDNQDSLIVFKGVFLR	840
841	NYTDLVASVYAADDERTNPLWESQPQSGNKNFYSGDPKNPKSSIIPTEWNGTDSEGNA	900
901	LADGKYQYVLTYSSEVPGAAVQTMIFDVIDRESPVITATYDETNTFNPRPAIEKGES	960
961	GLYREQVFYLVADASGVTTIPSLKNGDVTVSDNKVFVAQNDDGSFTLPLDLADISKFY	1020
1021	TVEDYAGNISYEKVENLISIGNEKGLVTVNILDKDTNSPVPILFSYSVTDETGKIVAELP	1080
1081	RYAGDTSVLKLPFGTYTDFDLFLYDTERSRLAGETKAVVTILEDNSTAEVNFYVTLKDKAN	1140
1141	LLIDIDALLPSGSTIQLVTDAGQAIQLPNAKYSKTDYGKFFVPVGTYTILPTLPEGYEFLE	1200
1201	ELDVAVLANQSNVKKLTLINKVALKELIAELAGLEETARYYNASPELQTAYAKALEDANA	1260
1261	VYANKHNQAQVDSALASLVAAREQLNGQATDKEKLIAEVSNYTPQTQANFIYYNAENTKQI	1320
1321	AYDTAVRSAQLVNLQENVTAQAVVNQALADLLAAKANLDGQKTDISALRSVSVSSVLKAT	1380
1381	DAKYLNASENVKQAYDQAVEAAKAILVDESASQASVDQALAVLTSQAELDGVATSTNDA	1440
1441	KEPANTATDKKDEGTVTPPPIDSEIVDVQAPPVKDTGNSEHVPI SQKPNPQPTLPRPVTL	1500
1501	QASLSSPNQEKQVTQLPNTGENDTKYYLVPGVIIGLGTLLVSIRRHKEEV	1550

Figure 38. Recouvrement de la séquence de la protéine PrtS libre de *Streptococcus thermophilus* 4F44 (GI:284080587 sans peptide signal) avec les peptides tryptiques identifiés par l'analyse ESI-FT-ICR MS/MS présentant un mascot score supérieur à 30 (P<0,05) (logiciel MASCOT, Perkins *et al.*, 1999).

Les peptides retrouvés sont grisés.

Le motif d'ancrage LPNTG est encadré.

3. Recherche d'autres protéines extracellulaires libérées dans le milieu

Dans un premier temps, nous avons réalisé une analyse *in silico*, à partir des quatre génomes (LMD-9, CNRZ1066, LMG18311 et ND03) entièrement séquencés, le génome de la souche 4F44 n'étant pas connu, afin de rechercher les séquences codantes de protéines susceptibles d'être exportées et ancrées à la paroi par SrtA. Il est donc nécessaire de rechercher à l'extrémité N-terminale la présence d'une séquence signal adressant la protéine vers l'extérieur, et à l'opposé un domaine d'ancrage contenant le motif "LPXTG" reconnu par SrtA. Cette analyse a permis de trouver 6 différentes séquences codantes de protéines susceptibles d'être exportées et ancrées à la paroi par la sortase (Tableau 16).

Dans un deuxième temps, les protéines extracellulaires du milieu de culture ont été séparées par PAGE-SDS puis caractérisées soit par microséquençage d'Edman après transfert sur membrane, soit en réalisant une analyse par spectrométrie de masse de l'hydrolysat trypsique d'une bande prélevée dans le gel.

3.1. Analyse *in silico* des protéines libérées dans le milieu

Deux à six protéines peuvent être potentiellement retrouvées dans le milieu extracellulaire en raison d'une sortase déficiente chez les 4 souches entièrement séquencées. Ces protéines sont répertoriées dans le tableau 16.

3.2. Identification des protéines libérées dans le milieu extracellulaire de la souche 4F44

Les protéines du milieu extracellulaire ont été récupérées et séparées par PAGE-SDS ; cinq bandes protéiques sont observées (Figure 39). Les protéines (contenues dans les bandes A, B, C, D, E) ont été caractérisées après digestion trypsique et obtention des masses des peptides générés (par spectrométrie de masse). La bande D a également été caractérisée par dégradation d'Edman.

Tableau 16. Recherche de protéines potentiellement ancrées à la paroi car contenant le motif LPXTG chez *Streptococcus thermophilus*, à l'aide du logiciel « NCBI blast ».

Protéines	Nombre de résidus composant le peptide signal	motif	pI	Protéine entière	Protéine sans le peptide signal	
				Masse Moléculaire (kDa)	pI	Masse Moléculaire (kDa)
Protéines présentes chez les souches LMG18311, CNRZ1066 et LMD-9, ND03						
ABC-type amino acid transport system, permease et periplasmic component (GI:116627112)	24	LPATG	9,12	56,7	9,02	54,3
DMT (Drug/metabolite transporter) family permease (GI:55823527 ou 116628314)	30	LPLTG	9,93	32,5	9,88	29,4
Protéines présentes chez les souches LMG18311 et LMD-9						
Putative small multi-drug export protein (GI:116627034)	26	LPGTG	9,70	16,8	9,60	13,9
Protéines présentes chez les souches CNRZ1066 et LMD-9						
2',3'-cyclic nucleotide 2'-phosphodiesterase/ 3'-nucleotidase bifunctional periplasmic precursor protein (GI:116627097)	29	LPNTG	4,87	91,3	4,81	88,2
Protéines présentes uniquement chez la souche LMD-9						
MUCin-Binding Protein (GI:116627423)	49	LPNTG	5,06	108,4	4,95	103,1
PrtS (GI:116627664)	35	LPNTG	4,38	173,0	4,34	169,4

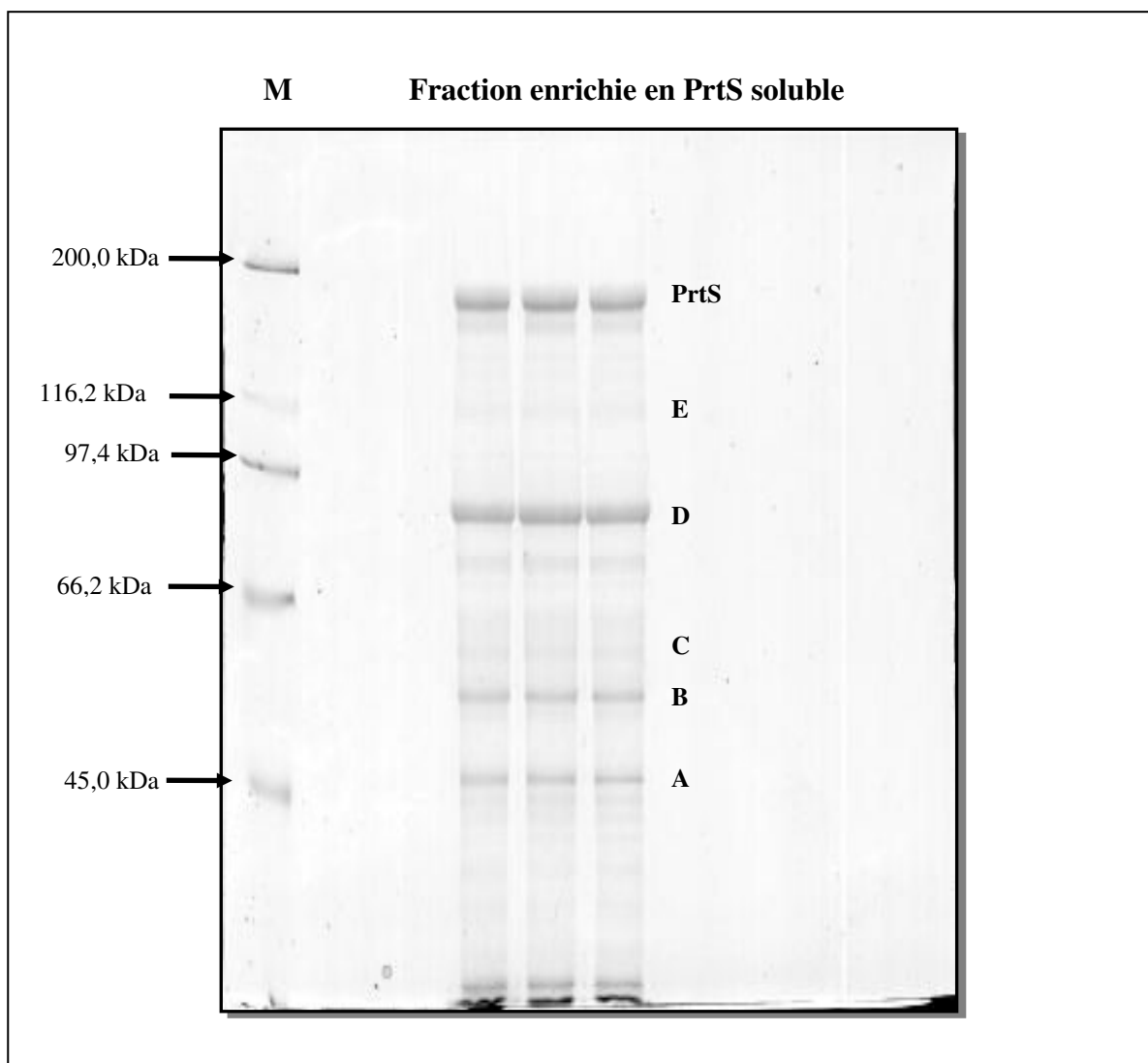


Figure 39. Mise en évidence par PAGE-SDS des protéines présentes dans la fraction enrichie obtenue à partir du milieu de culture de *Streptococcus thermophilus* 4F44 cultivée en milieu M17 pendant 6 h à 42°C.

Cinq bandes (A, B, C, D, E) ont été découpées et soumises à l'analyse en spectrométrie de masse MALDI-TOF/MS.

M : myosine (200,0 kDa), β -galactosidase (116,2 kDa), phosphorylase b (97,4 kDa), sérum albumine bovine (66,2 kDa), ovalbumine (45,0 kDa).

Après analyse des résultats des peptides tryptiques récupérés à partir de la bande protéique A de masse apparente 45 kDa, deux lots de peptides ont pu être réalisés. Le premier contient 18 peptides attribués à la phosphoglycérate kinase (PGK) et le deuxième lot en contient 26 issus de l'énolase.

Les deux bandes B et C de masses apparentes respectives 56 kDa et 60 kDa contiennent la même protéine. Les peptides tryptiques (5 pour la bande B et 12 pour la bande C) sont attribués au facteur d'élongation Tu (EF-Tu).

La protéine contenue dans la bande D de masse apparente 94 kDa a donné, après hydrolyse tryptique, 11 peptides attribués à la protéine de fixation au glycane appelée GBP "Glucan Binding Protein". L'extrémité N-terminale de la protéine provenant de la bande D est composée de 22 résidus d'acides aminés EDYDSQIAATNNAISNLSQQE correspondant à l'extrémité N-terminale de la GBP mature dont le peptide signal a été éliminé.

Pour la bande E de masse moléculaire apparente de 115 kDa, les peptides tryptiques issus de son hydrolyse correspondent à la protéine PrtS.

Ainsi, aucune protéine susceptible d'être ancrée à la paroi de la bactérie (Tableau 16) n'a été retrouvée sous forme libre. Donc, soit les gènes codant ces protéines sont absents dans la souche 4F44, soit les conditions expérimentales choisies n'ont pas permis leur récupération, soit les protéines concernées sont bien ancrées à la paroi.

Partie III

Etude de la spécificité de coupure d'une fraction enrichie contenant la protéase PrtS sur les caséines bovines

1. Evaluation de l'hydrolyse des caséines α_{s1} et β en mélange par une fraction enrichie de PrtS libre de *S. thermophilus* 4F44

L'hydrolyse des caséines par la protéase de *S. thermophilus* est la principale source d'acides aminés nécessaires à une forte croissance de cette bactérie dans le lait. Dans cette étude préliminaire, l'hydrolyse des caséines α_{s1} et β par la fraction enrichie en enzyme PrtS soluble a été suivie par PAGE-urée et par RP-HPLC.

La fraction enrichie en PrtS soluble (ne contenant qu'une activité protéolytique) a été obtenue à partir du surnageant de culture de la souche 4F44 cultivée à 42°C pendant 6 h (pH de 4,6) comme indiqué dans la partie Matériels et Méthodes (Figure 17).

1.1. Suivi de l'hydrolyse par RP-HPLC

Le mélange de caséines α_{s1} et β a été soumis à l'hydrolyse à 37°C par PrtS (apporté par le lyophilisat) dans un tampon phosphate 50 mM pH 7,5. Pour suivre l'hydrolyse des caséines, des fractions aliquotes de milieu réactionnel ont été prélevées à différents temps (0, 2, 4, 24 et 48 h) et chauffés (100°C - 5 min) pour arrêter la réaction enzymatique, puis centrifugés, filtrés et lyophilisés en vue de leur analyse.

Chaque hydrolysats a été analysé en premier par PAGE-urée (Figure 40) puis les peptides générés ont été séparés par RP-HPLC. Les suivis par PAGE-urée ou RP-HPLC de l'hydrolyse montrent que la caséine β est préférentiellement dégradée par rapport à la caséine α_{s1} (Figures 40 et 41) : la bande protéique (ou le pic protéique) correspondant à la caséine β diminue plus rapidement que celle (celui) correspondant à la caséine α_{s1} (Figures 40 et 41). En RP-HPLC, 5 pics principaux ont été obtenus après 4 h d'hydrolyse (avec des temps de rétention de 14, 15, 22, 25 et 46 min) ; contre plus d'une trentaine après 24 h (Figure 41).

1.2. Caractérisation des peptides issus de l'hydrolyse des caséines α_{s1} et β par PrtS par spectrométrie de masse

L'analyse par spectrométrie de masse des peptides issus de l'hydrolyse du mélange de caséines α_{s1} et β , après 24 heures d'incubation, a permis de caractériser trente trois peptides issus de la caséine β (constitués de 5 à 14 résidus d'acide aminé) (Tableau 17) et uniquement 2 issus de de la caséine α_{s1} (₂₄FVAPFPEVF₃₂ et ₉₃GYLEQLL₉₉).

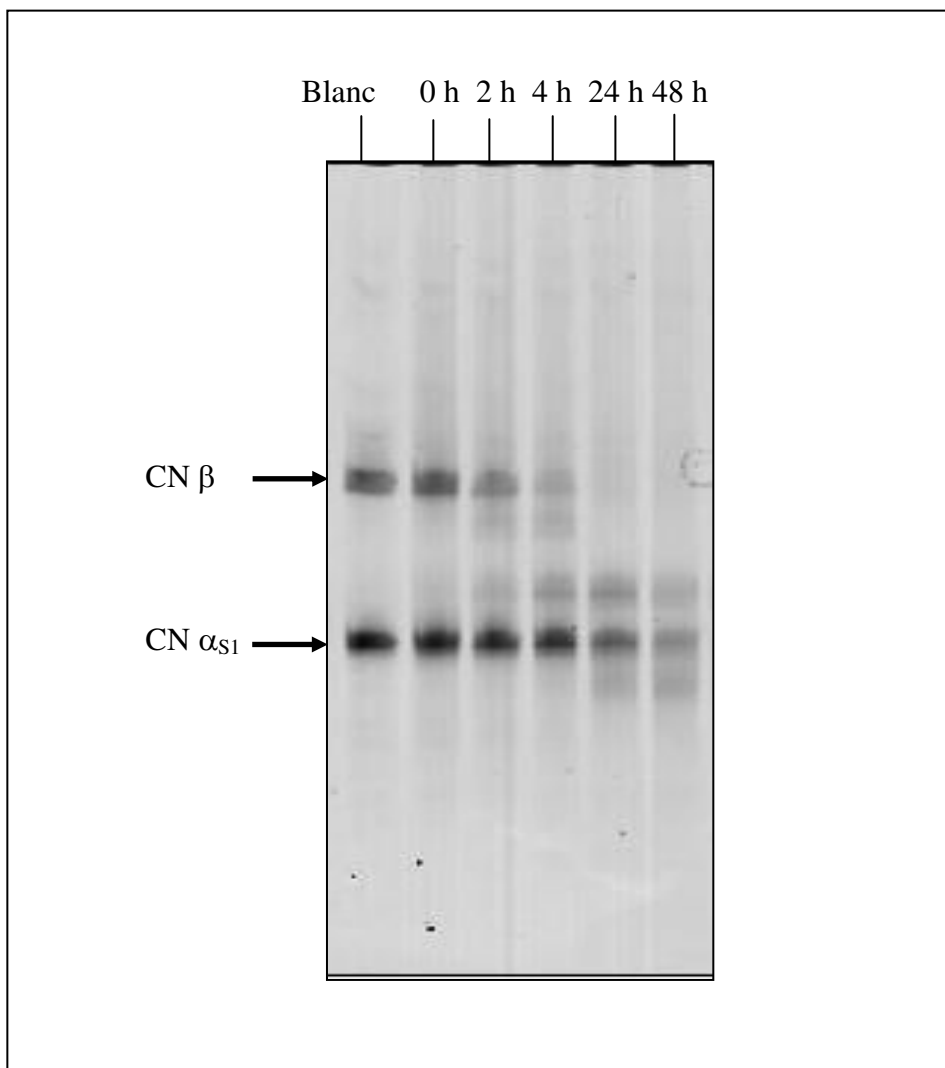


Figure 40. Suivi en PAGE-urée de l'hydrolyse d'un mélange de caséines α_{s1} et β par la fraction enrichie contenant PrtS soluble de *Streptococcus thermophilus* 4F44.

Un volume du mélange de caséines (à 1 mg/mL, phosphate de sodium 50 mM, pH 7,5) est mis en contact à 37°C pendant 0, 2, 4, 24 et 48 h avec un volume de fraction enrichie (5 mg/mL de lyophilisat). PrtS est apportée par la fraction enzymatique enrichie par précipitation sélective en fonction du pH du milieu de culture (milieu M17, 6 h de croissance à 42°C).

Le blanc ne contient que le mélange des 2 caséines.

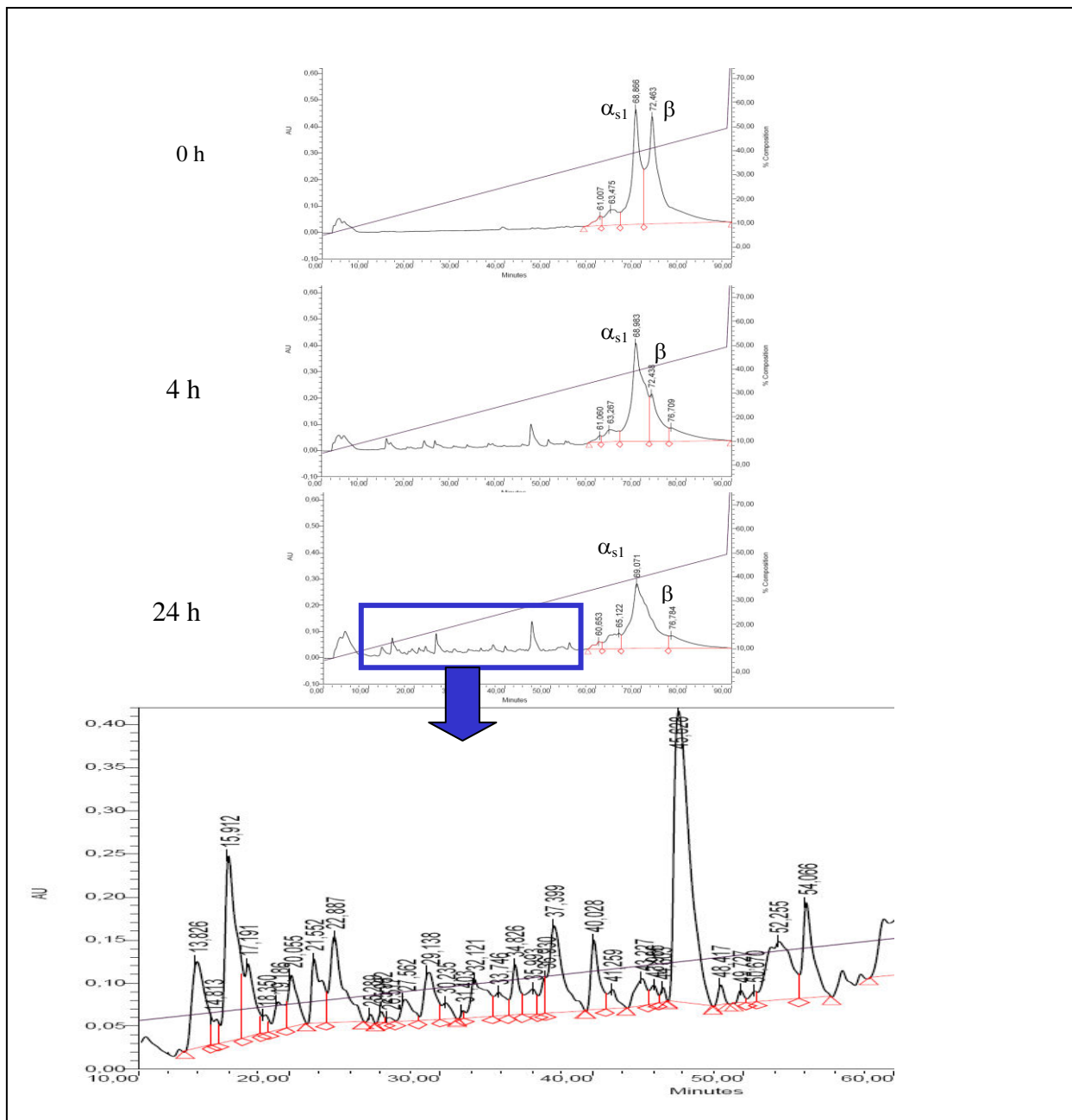


Figure 41. Suivi par RP-HPLC de la cinétique d’hydrolyse (0h, 4h et 24 h) d’un mélange de caséines α_{s1} et β par la fraction enrichie de *Streptococcus thermophilus* 4F44.

La fraction enzymatique a été obtenue par enrichissement après lavage et précipitation sélective en fonction du pH à partir du milieu de culture sur milieu M17 à 42°C après 6 h de croissance : voir Figure 17. Un volume de 400 μ L (0,32 mg d’hydrolysate lyophilisé) est injecté sur la colonne Stability C₁₈ (150 x 2 mm) et collecté en vue de l’analyse en spectrométrie de masse. Un gradient linéaire de 5-50% d’ACN en présence de 0,1% (v/v) de TFA est appliqué pendant 90 min. La portion encadrée du profil sur le chromatogramme de la caséine β hydrolysée (contenant α_{s1}) pendant 24 h a été collectée et soumise à la spectrométrie de masse.

Tableau 17. Peptides issus de l'hydrolyse de la caséine β , résultant de l'action pendant 24 h à 37°C de la protéase PrtS soluble présente dans la fraction enrichie du surnageant de culture de *Streptococcus thermophilus* 4F44 (après 6 h de culture à 42°C en milieu M17).

Les peptides ont été identifiés par spectrométrie de masse ESI -Q-TOF.

(P ₁) séquence (P' ₁)	Fragments
(M)GVSKVKEAM(A)	94 - 102
(K)HKEMPFKYPVEPF(T)	106 - 119
(H)KEMPFKYPVEPF(T)	107 - 119
(F)PKYPVEPFTESEQ(S)	112 - 123
(L)TLTDVENL(H)	126 - 133
(L)TLTDVENL(H) Désamidation (NQ)	126 - 133
(L)TLTDVENLHLPLPL(L)	126 - 139
(L)HLPLPLL(Q)	134 - 140
(L)HLPLPLLQ(S)	134 - 141
(H)LPLPLL(Q)	135 - 140
(H)LPLPLLQ(S)	135 - 141
(H)LPLPLLQS(W)	135 - 142
(H)LPLPLLQSW(M)	135 - 143
(H)LPLPLLQSWM(H)	135 - 144
(M)HQPHQPLPPT(V)	145 - 154
(M)HQPHQPLPPTVM(F)	145 - 156
(M)FPPQSVLSL(S)	157 - 165
(Q)SVLSLS(Q)	161 - 166
(Q)SVLSLSQ(S)	161 - 167
(L)SQSKVLPVPQ(K)	166 - 175
(L)SQSKVLPVPQK(A)	166 - 176
(Q)SKVLPVPQ(K)	168 - 175
(Q)SKVLPVPQK(A)	168 - 176
(S)KVLVPVPQ(K)	169 - 175
(K)VLPVPQ(K)	170 - 175
(V)LPVPQ(K)	171 - 175
(Q)KAVPYPQ(R)	176 - 182
(K)AVPYPQ(R)	177 - 182
(A)VPYPQ(R)	178 - 182
(F)LLYQEPVL(G)	191 - 198
(L)LYQEPVL(G)	192 - 198
(L)YQEPVLGPVR(G)	193 - 202
(R)GPFPIIV(-)	203 - 209

Pour la caséine β , 34 liaisons peptidiques rompues différentes, ont été identifiées. Les sites de coupure ont été localisés sur la séquence présentée dans la figure 42.

La sensibilité à l'enzyme des différentes régions de la caséine β semble très différente. Aucun peptide de la région N-terminale 1 à 92 n'a été libéré ; en revanche, la partie C-terminale, des résidus 93 à 209 a été facilement hydrolysée par la forme libre de PrtS de la souche 4F44.

Après ces résultats préliminaires, nous avons voulu tester l'hydrolyse des caséines et des protéines lactosériques.

Un milieu de culture YL contenant de l'extrait de levure, du lactose, de l'urée et du nickel a permis d'obtenir après 16 h de culture un milieu extracellulaire, dont le pH était proche de 6,2, riche en protéase PrtS. En effet, l'acidification (précipitant l'enzyme habituellement) due à la production d'acide lactique enregistrée (pH 4,5 en fin de croissance en milieu M17) a été compensée par le rejet d'ammoniaque (produit de dégradation de l'urée par l'uréase). Le fait de récupérer le surnageant après une nuit d'incubation dans le milieu YL supplémenté en urée et nickel, a permis d'enchaîner les manipulations simples. En effet, contrairement à ce qui a été fait précédemment, aucune étape de précipitation, lavage, concentration, dialyse, lyophilisation, congélation, remise en solution n'a été réalisée et ce, afin que la protéase ne se dégrade pas et ne perde pas son activité.

2. Hydrolyse de protéines laitières par le surnageant de culture de

S. thermophilus 4F44

Avant de réaliser la protéolyse des protéines du lait avec le surnageant de culture, la présence d'activité protéasique dans ce surnageant a été confirmée avec le substrat synthétique (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA). L'activité obtenue de l'enzyme était de 14,3 nmol pna/mL/min. De plus, aucune activité peptidasique n'a été détectée (sur Lys-pNA) dans ce surnageant de culture, les cellules bactériennes n'ont pas été lysées et n'ont donc pas libéré leurs peptidases intracellulaires. Un zymogramme a été réalisé sur cette fraction, seule les bandes de caséinolyse spécifiques à PrtS ont été détectées.

Pour réaliser la caséinolyse, un volume du surnageant de culture filtré contenant la protéase PrtS a été ajouté à un volume de solution de caséine entière à 0,2 ou 0,02% (m/v) solubilisée dans un tampon spécifique. Le tampon d'hydrolyse contenant du CaCl_2 à 5 mM est composé soit de Tris-HCl 100 mM pH 7, soit de MES-NaOH 100 mM pH 6.

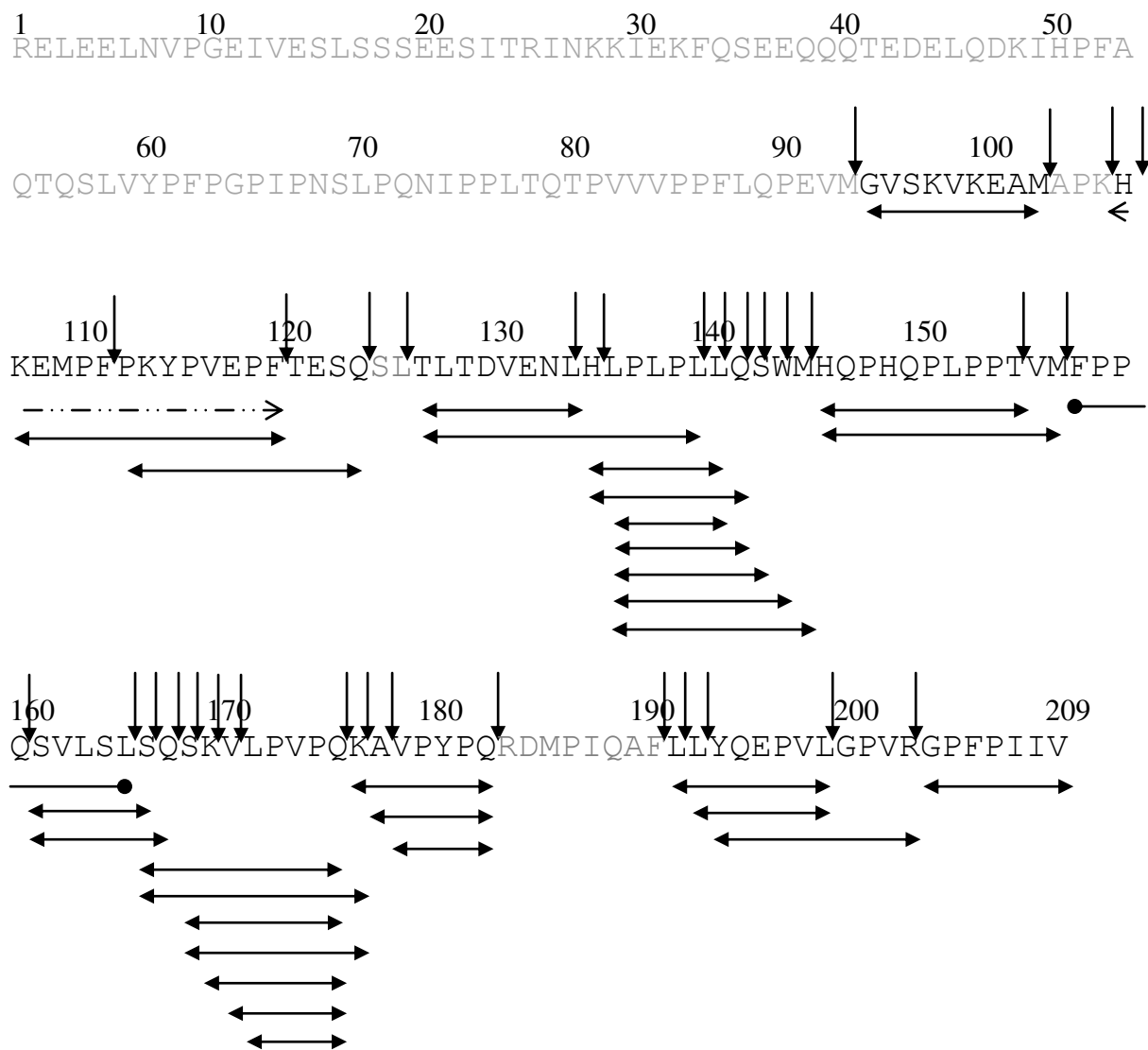


Figure 42. Localisation sur la séquence de la caséine β variant A2 des peptides résultant de l'action durant 24 h de fraction enrichie contenant la forme soluble de PrtS de *Streptococcus thermophilus* 4F44 sur le mélange de caséines β et α_{s1} .

Les flèches verticales indiquent les liaisons hydrolysées et les flèches horizontales les peptides libérés.

Ces peptides ont été identifiés par spectrométrie de masse ESI-Q-TOF.

Les mélanges réactionnels ont été incubés à 37°C. Des fractions aliquotes de milieu réactionnel ont été prélevées au cours du temps (après 1 h, 4 h, 22 h), du TFA ajouté pour atteindre une valeur de pH égale à 2 afin d'arrêter la réaction enzymatique.

Pour l'hydrolyse des protéines lactosériques, un volume de surnageant contenant la forme soluble de PrtS a été ajouté à un volume de solution de protéines lactosériques puis incubé à 37°C (4 h et 22 h). Les protéines lactosériques ont été préalablement solubilisées à 0,2% (m/v) dans un tampon d'hydrolyse contenant du CaCl₂ à 5 mM et du Tris-HCl 100 mM à pH 7 ou du MES-NaOH 100 mM à pH 6.

Tous les prélèvements ont été centrifugés et filtrés pour être analysés en RP-HPLC (Figure 43).

2.1. Suivi par RP-HPLC de l'hydrolyse de la caséine entière

Les profils d'HPLC obtenus ont montré que la caséine entière a été hydrolysée par la protéase PrtS libre contenue dans le surnageant de culture filtré (après croissance en milieu YL modifié) et ce quelles que soient les conditions expérimentales : temps d'hydrolyse (1 h, 4 h ou 22 h), concentration finale en caséine entière (0,1% ou 0,01%) et quel que soit le tampon utilisé. Seuls les profils obtenus après 1 h, 4 h et 22 h à pH 6 et 7 avec la concentration finale de caséine 0,1% (m/v) sont présentés à la figure 43.

Les profils d'HPLC montrent que la caséine entière est plus dégradée après 22 h d'hydrolyse aux pH 6 ou 7 : à ces deux pH la majorité des pics sont présents à 4 h et à 22 h. L'amplitude des pics est plus importante à 22 h sauf pour deux d'entre eux (temps de rétention 50 et 56 minutes) lors de l'hydrolyse à pH 6 et 2 (temps de rétention 34 et 61 minutes) lors de l'hydrolyse à pH 7. Il y a peu de différences d'hydrolyse entre les deux conditions de pH, à 4 h ou à 22 h. En comparant les aires des pics, nous avons remarqué qu'elles sont légèrement supérieures pour l'hydrolyse réalisée à pH 7. Au cours du temps, l'augmentation de l'amplitude d'un pic montre que l'hydrolyse est plus prononcée, alors que la diminution de l'amplitude d'un pic montre que le(s) peptide(s) disparaît(ssent) par une hydrolyse laissant apparaître vraisemblablement de nouveaux pics. Il est donc difficile de tirer des conclusions sur ces profils, ces analyses ont été réalisées essentiellement pour visualiser dans quelles conditions une caséinolyse était détectée. Comme la caséinolyse est avérée, la caractérisation des peptides générés a été menée par spectrométrie de masse ESI Q-TOF.

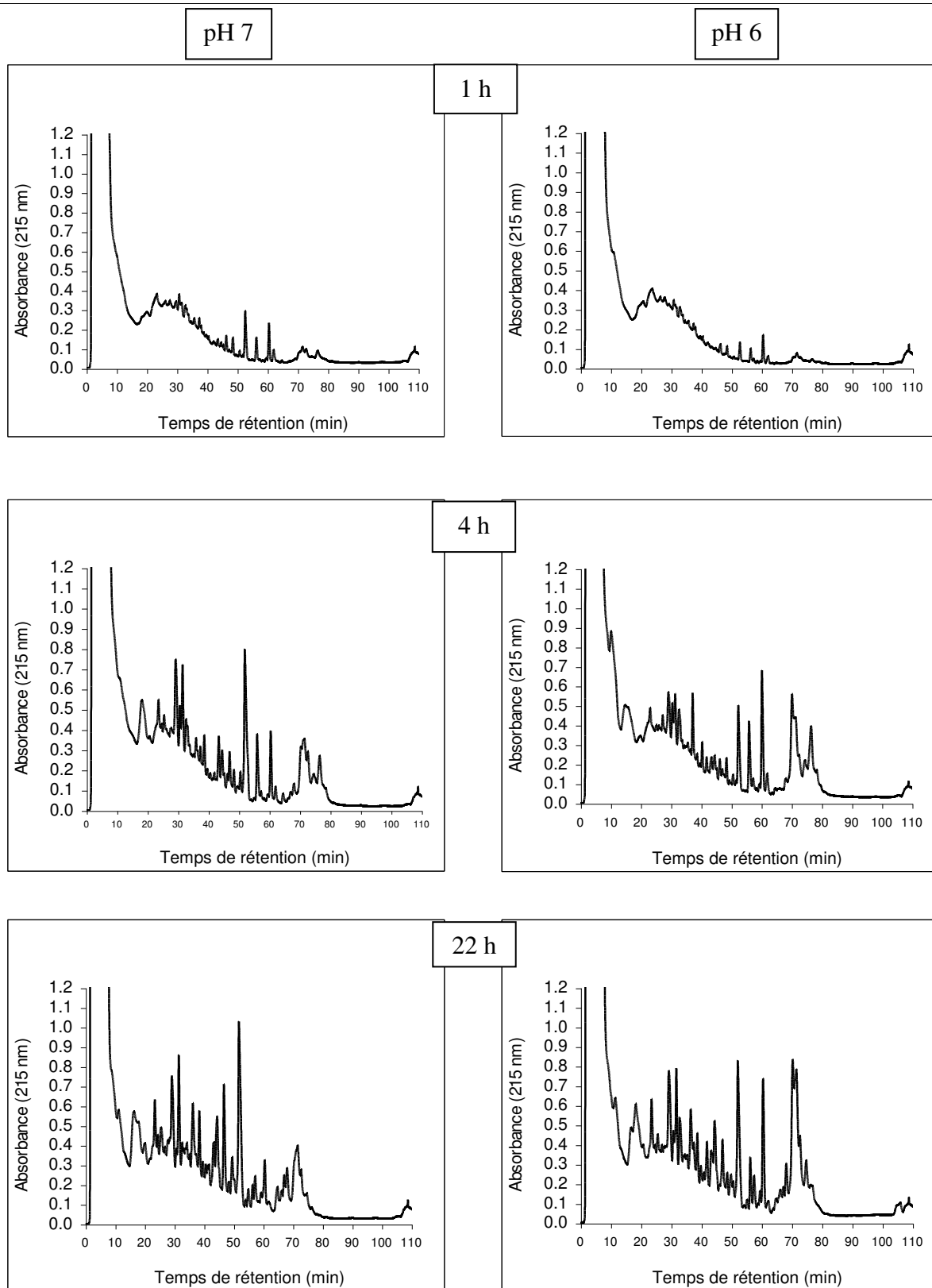


Figure 43. Profils RP-HPLC des hydrolysats obtenus à différents temps d'hydrolyse (1 h, 4 h et 22 h) de la caséine entière bovine (0,1% m/v) par le surnageant de culture (YL, urée et nickel) contenant PrtS après 16 h de croissance de *Streptococcus thermophilus* 4F44.

1 volume de caséine dissoute dans du tampon MES NaOH pH 6, 50 mM ou Tris-HCl pH 7, 50 mM a été ajouté à 1 volume de milieu YL contenant la protéase.

2.2. Hydrolyse des protéines lactosériques par RP-HPLC.

Le suivi de l'hydrolyse a été réalisé après 4 h et 22 h. Nous ne présentons sur la figure 44 que les profils chromatographiques obtenus avec les échantillons ayant subi une hydrolyse de 22 h. En effet, après 4 h, l'hydrolyse était très peu marquée. Les deux profils proposés obtenus après 22 h d'hydrolyse soit à pH 6, soit à pH 7 ne montrent pas de différences significatives. L'amplitude des pics est sensiblement plus importante pour la majorité de ceux issus de l'hydrolyse à pH 7. Ces analyses RP-HPLC, ne présentent que des pics de faibles amplitudes comparés à ceux obtenus avec la caséine entière, ainsi nous n'avons pas caractérisé les peptides issus de cette hydrolyse. Nous pouvons néanmoins conclure que les protéines lactosériques ne sont pas de bons substrats pour la protéase PrtS.

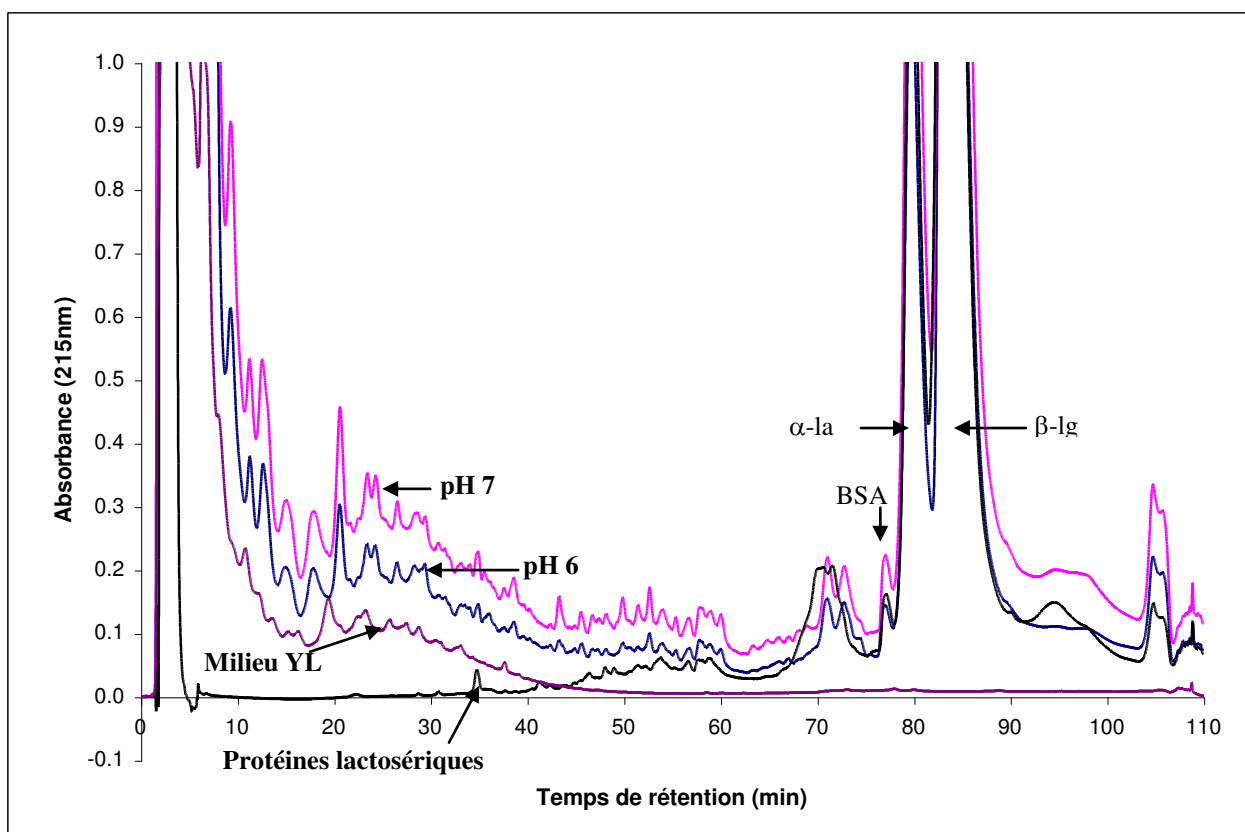


Figure 44. Profils RP-HPLC des hydrolysats (22h) des protéines lactosériques bovines (0,1% m/v) par le surnageant de culture (YL, urée et nickel) contenant la protéase PrtS après une croissance de *Streptococcus thermophilus* 4F44 pendant 16 h.

1 volume de protéines lactosériques dissoutes dans du tampon MES NaOH pH 6, 50 mM (Chromatogramme bleu) ou Tris-HCl pH 7 50 mM a été ajouté à 1 volume de milieu YL contenant la protéase (Chromatogramme rose). Les deux chromatogrammes témoins (noir et mauve) correspondent respectivement aux protéines lactosériques et au milieu de culture YL.

2.3. Caractérisation des peptides issus de la caséinolyse

Les séquences des peptides issus de l'hydrolyse de la caséine entière (à 0,1% ou 0,01%, m/v) après 1 h, 4 h et 22 h à pH 7 ou 6, ont été déduites après obtention de leur masse (par spectrométrie de masse). Les fragments peptidiques et leur séquence sont listés par caséine dans les tableaux 18, 19, 20 et 21, et leur présence est mentionnée en fonction des conditions d'obtention. Ainsi, la caséine β est la caséine la plus dégradée, toutes conditions expérimentales confondues, 177 peptides différents ont été générés. Seuls 99 peptides ont été recensés pour la caséine α_{s1} , alors que cette dernière est présente dans la caséine entière dans des proportions proches de la caséine β . Par ailleurs, 62 et 14 peptides ont été retrouvés, respectivement issus de l'hydrolyse des caséines α_{s2} et κ , les moins abondantes et les moins dégradées. Le nombre de fragments peptidiques issus de l'hydrolyse de la caséine entière (à 0,1 ou 0,01%) au cours du temps (1 h, 4 h ou 22 h) à pH 6 ou 7 sont mentionnés dans le tableau 22.

2.3.1. Comparaison du nombre et de la taille des peptides entre 1 h et 4 h d'hydrolyse

Dans certains cas, il y a plus de peptides générés à pH 7 qu'à pH 6. Par exemple, après 4 h d'hydrolyse, 36 peptides issus de l'hydrolyse de la caséine α_{s2} sont obtenus à pH 7 contre 26 à pH 6. Dans d'autres cas c'est l'inverse, après 4 h d'hydrolyse, 86 peptides issus de l'hydrolyse de la caséine β sont obtenus à pH 7 contre 90 à pH 6. Le nombre de peptides obtenus pour chaque caséine augmente entre 1 h et 4 h d'hydrolyse. Pour la caséine β , à pH 7 (à pH 6), après 1 h d'hydrolyse le nombre de peptides passe de 61 (49) à 86 (90) après 4 h.

La taille moyenne des fragments peptidiques obtenus issus de chaque caséine est mentionnée dans le tableau 23. Ainsi pour la caséine β , à pH 7 (à pH 6), après 1 h d'hydrolyse la taille des peptides est de $14,9 \pm 7,7$ résidus d'acide aminé ($14,3 \pm 6,8$ à pH 6) et passe à $13,1 \pm 6,6$ résidus d'acide aminé ($13,9 \pm 6,9$ à pH 6) après 4 h. Les fragments peptidiques sont donc de taille similaire.

2.3.2. Comparaison du nombre et de la taille des peptides entre 4 h et 22 h d'hydrolyse

Le nombre de peptides obtenus pour chaque caséine augmente sensiblement entre 4 h et 22 h d'hydrolyse. Pour la caséine β , à pH 7 (à pH 6), après 4 h d'hydrolyse le nombre de peptides passe de 86 (90 à pH 6) à 97 (100 à pH 6) après 22 h. La taille moyenne des fragments peptidiques issus de l'hydrolyse de la caséine β , à pH 7 (à pH 6), après 4 h d'hydrolyse passe de $13,1 \pm 6,6$ résidus d'acide aminé ($13,9 \pm 6,9$ à pH 6) à $11,9 \pm 6,5$ résidus d'acide aminé ($12,8 \pm 6,4$ à pH 6) après 22 h.

Tableau 18. Peptides issus de l'hydrolyse de la caséine β contenue dans 0,1 ou 0,01% de caséine entière, résultant de l'action pendant 1, 4 ou 22 h à pH 7 ou 6 à 37°C de la protéase PrtS soluble présente dans le surnageant de culture de *Streptococcus thermophilus* 4F44 (après 16 h de culture à 42°C dans le milieu YL + nickel + urée).

Les peptides ont été identifiés par spectrométrie de masse ESI-Q-TOF.

(P₁) peptide (P'₁) : (P₁) = résidu positionné en C-ter du peptide précédent et (P'₁) = résidu positionné en N-ter du peptide suivant sur la séquence protéique théorique. X ou **X** : peptide est retrouvé respectivement dans certaines conditions ou pour toutes les conditions d'hydrolyse.

(P ₁) séquence (P' ₁)	Fragments	Caséine entière (m/v)							
		0,1%				0,01%			
		Temps d'hydrolyse							
		1 h	4 h	22 h	1 h	22 h	1 h	22 h	1 h
		pH d'hydrolyse							
		7	6	7	6	7	6	7	7
(-)RELEELNVPGEIVE(S)	1-14				X		X		
(T) RINKKIEKFQ (S)	25-34						X		
(T)RINKKIEKFQSEEQQ(Q)	25-39						X		
(T) RINKKIEKFQSEEQQ(T)	25-40				X	X	X		
(R)INKKIEKFQSEEQQ(T)	26-40						X		
(L)QDKIHFAQTQ(S)	46-56						X		
(Q)DKIHFAQTQ(S)	47-52					X			
(Q)DKIHFAQTQ(S)	47-56						X		
(Q)SLVYPPFGPIP(S)	57-68					X	X		X
(Q)SLVYPPFGPIP(SLQ(N)	57-72					X	X		X
(S)LVYPPFGPIP(S)	58-68					X			
(L)VYPPFGPIP(S)	59-68			X		X	X		X
(Y)PPFGPIP(S)	61-68	X	X	X	X		X	X	
(Q)NIPPLTQTPV(V)	73-82		X			X	X	X	X
(N)IPPLTQTPV(V)	74-82	X	X	X	X			X	X
(L)TQTPVVPPF(L)	78-87					X			
(V)VVPFLQPE(V)	83-91					X			
(V)VVPFLQPEVM(G)	83-93					X	X		X
(V)VPPFLQPEV(M)	84-92	X	X		X				X
(V)VPPFLQPEVM(G)	84-93					X	X		X
(V)PPFLQPEV(M)	85-92		X						
(V)PPFLQPEVM(G)	85-93					X			
(M)GVSKVKEA(M)	94-101					X			
(M)GVSKVKEAMAPK(H)	94-105	X		X	X	X	X		
(M)GVSKVKEAMAPKHKEMPPFKYPVEPF(T)	94-119			X	X		X		
(M)GVSKVKEAMAPKHKEMPPFKYPVEPFTESQ(S)	94-123				X		X		
(S)KVKEAMAPK(H)	97-105			X	X	X	X		X
(S)KVKEAMAPKHK(E)	97-107			X		X	X		
(S)KVKEAMAPKHKEMPPFKYPVEPF(T)	97-119	X	X	X	X	X			
(S)KVKEAMAPKHKEMPPFKYPVEPFTESQ(S)	97-123	X		X	X	X	X	X	X
(K)VKEAMAPK(H)	98-105					X			
(K)EAMAPKHKEMPPFKYPVEPFTESQ(S)	100-123			X	X	X	X		
(A)MAPKHKEMPPFKYPVEPF(T)	102-119					X	X		
(A)MAPKHKEMPPFKYPVEPFTESQ(S)	102-123						X		
(K)HKEMPPFKYPVEPF(T)	106-119	X	X	X	X	X	X	X	X

Résultats - Partie III

(K)HKEMPFKYPVEPFTE(S)	106-121						X		
(K)HKEMPFKYPVEPFTE(SQ(S))	106-123	X	X	X	X	X	X	X	X
(K)HKEMPFKYPVEPFTE(SQSL(T))	106-125	X		X					
(H)KEMPFKYPVEPF(T)	107-119			X		X	X		X
(K)EMPFK(Y)	108-113	X	X	X	X	X	X	X	X
(K)EMPFKYPVEPF(T)	108-119			X	X	X	X		
(K)EMPFKYPVEPFTE(SQ(S))	108-123	X	X	X	X		X		X
(F)PKYPVEPFTE(SQ(S))	112-123			X		X	X		X
(K)YPVEPF(T)	114-119		X	X	X			X	X
(K)YPVEPFTE(SQ(S))	114-123	X							
(F)TESQSLTLTDVENLHPLP(L)	120-138					X			
(F)TESQSLTLTDVENLHPLP(L)PLLSWMLHQPPLPPT							X		
(V)	120-154								
(Q)SLTLTDVE(N)	124-131			X	X	X	X		
(Q)SLTLTDVEN(L)	124-132			X	X	X	X		X
(Q)SLTLTDVENLHPLP(L)	124-138					X			
(Q)SLTLTDVENLHPLP(L)Q(S)	124-141						X		
(Q)SLTLTDVENLHPLP(L)PLLSWMLHQPPLPPT(V)	124-154	X	X	X	X	X	X	X	X
(Q)SLTLTDVENLHPLP(L)PLLSWMLHQPPLPPTVMFP						X			
PQ(S)	124-160								
(L)TLTDVE(N)	126-131					X	X		
(L)TLTDVEN(L)	126-132					X			
(L)TLTDVENL(H)	126-133	X		X	X	X	X		X
(L)TLTDVENLHPLP(L)	126-138					X			
(L)TLTDVENLHPLP(L)	126-139			X		X			
(L)TLTDVENLHPLP(L)Q(S)	126-141	X		X	X	X	X	X	
(L)TLTDVENLHPLP(L)PLLSWMLHQPPLPPT(V)	126-154	X		X	X	X	X		X
(T)LTDVENL(H)	127-133								X
(T)LTDVENLHPLP(L)	127-139					X	X		
(T)LTDVENLHPLP(L)PLLSWMLHQPPLPPT(V)	127-154			X		X			X
(L)TDVENL(H)	128-133					X	X		
(L)TDVENLHPLP(L)Q(S)	128-141			X					
(L)TDVENLHPLP(L)PLLSWMLHQPPLPPT(V)	128-154			X	X	X	X		X
(T)DVENLHPLP(L)	129-139						X		
(T)DVENLHPLP(L)PLLSWMLHQPPLPPT(V)	129-154					X	X		
(E)NLHPLP(L)	132-139				X	X			X
(E)NLHPLP(L)Q(S)	132-141			X	X	X	X		X
(N)LHPLP(L)	133-139				X				
(N)LHPLP(L)Q(S)	133-141	X	X	X	X	X	X	X	X
(N)LHPLP(L)PLLSWMLHQPPLPPT(V)	133-154				X				
(L)HLPLP(L)	134-139			X		X	X		
(L)HLPLP(L)Q(S)	134-140			X		X	X		X
(L)HLPLP(L)Q(S)	134-141	X		X	X	X	X	X	X
(L)HLPLP(L)Q(S)(W)	134-142						X		X
(L)HLPLP(L)Q(S)(M)	134-143						X		X
(L)HLPLP(L)Q(S)(H)	134-144			X	X	X	X		X
(L)HLPLP(L)Q(S)(M)(HQPPLPPT(V))	134-154			X	X	X	X		
(L)HLPLP(L)Q(S)(M)(HQPPLPPTVMFPQ(S))	134-160			X					
(H)LPLP(L)	135-139		X			X	X		X
(H)LPLP(L)Q(S)	135-140					X	X		
(H)LPLP(L)Q(S)	135-141			X	X	X	X		X
(H)LPLP(L)Q(S)(W)	135-142					X	X		X

Résultats - Partie III

(H)LPLPLLSQSW(M)	135-143					X	X		X
(H)LPLPLLSQSW(H)	135-144					X			X
(L)PLPLLQ(S)	136-141					X			
(P)LPLLQ(S)	137-141					X			
(L)PLLSQSW(M)	138-143					X			X
(P)LLQSWMHQPHQPLPPT(V)	139-154					X			
(P)LLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQ(S)	139-160					X			
(L)LQSWMHQPHQPLPPT(V)	140-154			X	X	X	X		
(Q)SWMHQPHQPLPPT(V)	142-154	X		X	X	X	X		X
(Q)SWMHQPHQPLPPTVM(F)	142-156			X	X		X		
(Q)SWMHQPHQPLPPTVMFPPQ(S)	142-160			X	X	X	X		X
(Q)SWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVL(S)	142-163				X		X		
(S)WMHQPHQPLPPT(V)	143-154					X	X		
(W)MHQPHQPLPPT(V)	144-154			X		X	X		
(M)HQPHQPLPPT(V)	145-154				X	X	X	X	X
(M)HQPHQPLPPTVM(F)	145-156			X	X	X	X		X
(M)HQPHQPLPPTVMFPPQ(S)	145-160					X			
(T)VMFPPQ(S)	155-160						X		
(T)VMFPPQSVL(S)	155-163	X	X	X	X	X			
(T)VMFPPQSVLSL(S)	155-165			X		X	X	X	X
(V)MFPPQSVL(S)	156-163						X		
(V)MFPPQSVLSL(S)	156-165			X					
(M)FPPQSVLSL(S)	157-165			X	X	X			X
(F)PPQSVLSL(S)	158-165					X			
(Q)SVLSLS(Q)	161-166				X	X			X
(Q)SVLSLSQ(S)	161-167	X	X	X	X	X	X	X	X
(Q)SVLSLSQS(K)	161-168			X	X		X		
(Q)SVLSLSQSKVLPVPQKAVPYPQ(R)	161-182		X		X				
(L)SLSQSKVLPVPQ(K)	164-175	X	X		X				
(L)SLSQSKVLPVPQK(A)	164-176						X		
(L)SLSQSKVLPVPQKAVPYPQ(R)	164-182	X	X	X	X		X	X	
(L)SLSQSKVLPVPQKAVPYPQR(D)	164-183				X				
(L)SLSQSKVLPVPQKAVPYPQRDMPIQAF(L)	164-190	X							
(L)SLSQSKVLPVPQKAVPYPQRDMPIQAFLL(Y)	164-192	X	X		X				
(S)LSQSKVLPVPQ(K)	165-175			X	X				
(L)SQSKVLPVPQ(K)	166-175	X	X	X	X	X	X	X	X
(L)SQSKVLPVPQK(A)	166-176			X		X	X		
(L)SQSKVLPVPQKA(V)	166-177			X	X				
(L)SQSKVLPVPQKAVPYPQ(R)	166-182	X	X	X	X		X	X	
(L)SQSKVLPVPQKAVPYPQR(D)	166-183				X				
(L)SQSKVLPVPQKAVPYPQRDMPIQA(F)	166-189	X			X				
(L)SQSKVLPVPQKAVPYPQRDMPIQAF(L)	166-190		X		X				
(L)SQSKVLPVPQKAVPYPQRDMPIQAFLL(Y)	166-192	X	X						
(L)SQSKVLPVPQKAVP YQRDMPIQAFLLYQEPVL(G)	166-198	X		X	X				
(S)QSKVLPVPQ(K)	167-175	X	X	X	X	X	X	X	X
(Q)SKVLPVPQ(K)	168-175	X	X	X	X	X	X	X	
(Q)SKVLPVPQKAVPYPQ(K)	168-182	X	X	X	X		X	X	
(Q)SKVLPVPQKAVPYPQRDMPIQAFLL(Y)	168-192		X						
(S)KVLPVPQ(K)	169-175	X		X	X	X	X	X	X
(S)KVLPVPQKAVPYPQ(R)	169-182			X	X				

Résultats - Partie III

(K)VLPVPQ(K)	170-175	X	X	X	X	X	X	X	X
(K)VLPVPQKAVPYPQ(R)	170-182	X	X	X	X		X	X	
(V)LPVPQ(K)	171-175			X	X	X	X		X
(L)PVPQKAVPYPQ(R)	172-182						X		
(Q)KAVPYPQ(R)	176-182	X	X	X	X	X	X	X	X
(Q)KAVPYPQR(D)	176-183						X		
(Q)KAVPYPQRDMPIQ(A)	176-188	X		X	X				
(Q)KAVPYPQRDMPIQA(F)	176-189	X	X	X	X			X	
(Q)KAVPYPQRDMPIQAF(L)	176-190	X	X		X				
(Q)KAVPYPQRDMPIQAF(L)	176-191		X						
(Q)KAVPYPQRDMPIQAFLL(Y)	176-192	X	X	X	X				
(Q)KAVPYPQRDMPIQAFLLYQEPVLGPVRGBPFPIIV(-)	176-209	X							
(K)AVPYPQ(R)	177-182	X		X		X	X	X	X
(A)VPYPQ(R)	178-182					X			X
(Q)RDMPIQ(A)	183-188			X					
(Q)RDMPIQA(F)	183-189	X		X	X	X	X	X	X
(Q)RDMPIQAF(L)	183-190	X		X	X		X	X	
(Q)RDMPIQAF(L)	183-191	X	X	X	X	X	X	X	
(Q)RDMPIQAFLL(Y)	183-192	X	X		X	X	X	X	
(Q)RDMPIQAFLLY(Q)	183-193	X		X				X	
(Q)RDMPIQAFLLYQEPVL(G)	183-198	X							
(Q)RDMPIQAFLLYQEPVLGPVRGBPFPIIV(-)	183-209	X	X						
(R)DMPIQAF(L)	184-191			X	X				X
(R)DMPIQAFLL(Y)	184-192	X	X	X	X	X	X	X	X
(R)DMPIQAFLLY(Q)	184-193			X					
(D)MPIQAFLL(Y)	185-192		X						
(Q)AFLLYQEPVLGPVRGBPFPIIV(-)	189-209	X	X						
(A)FLLYQEPVL(G)	190-198	X	X	X	X	X	X	X	
(A)FLLYQEPVLGPVRGBPFPIIV(-)	190-209	X	X	X	X				
(F)LLYQEPVL(G)	191-198	X			X	X		X	
(F)LLYQEPVLGPVRGBPFPIIV(-)	191-209	X	X	X	X			X	
(L)LYQEPVL(G)	192-198	X		X	X	X	X	X	X
(L)LYQEPVLGPVRGBPFPIIV(-)	192-209	X	X	X	X		X	X	
(L)YQEPVLGPV(R)	193-201			X	X				
(L)YQEPVLGPVRGBPFI(I)	193-206						X		
(L)YQEPVLGPVRGBPFI(V)	193-208	X	X		X				
(L)YQEPVLGPVRGBPFIIV(-)	193-209		X		X	X	X	X	X
(Y)QEPVLGPVRGBPFIIV(-)	194-209	X	X	X			X	X	
(L)GPVRGBPFI(V)	199-208	X	X	X	X				
(L)GPVRGBPFIIV(-)	199-209				X			X	X
(V)RGBPFIIV(-)	202-209				X				
(R)GPFIIV(-)	203-209					X			X

Tableau 19. Peptides issus de l'hydrolyse de la caséine α_{s1} contenue dans 0,1 ou 0,01% de caséine entière, résultant de l'action pendant 1, 4 ou 22 h à pH 7 ou 6 à 37°C de la protéase PrtS soluble présente dans le surnageant de culture de *Streptococcus thermophilus* 4F44 (après 16 h de culture à 42°C dans le milieu YL + nickel + urée).

Les peptides ont été identifiés par spectrométrie de masse ESI-Q-TOF

(P _i) séquence (P ^o _i)	Fragments	Caséine entière (m/v)							
		0,1%				0,01%			
		Temps d'hydrolyse							
		1 h	4 h	22 h	1 h	22 h	1 h	22 h	1 h
pH d'hydrolyse									
		7	6	7	6	7	6	7	7
(-)RPKHPIKH(Q)	1-8			X		X	X		X
(-)RPKHPIKHQ(G)	1-9			X		X	X		X
(-)RPKHPIKHQGLPQ(E)	1-13	X	X	X	X	X	X	X	X
(-)RPKHPIKHQGLPQE(V)	1-14	X	X	X	X	X	X		
(-)RPKHPIKHQGLPQEV(L)	1-15						X		
(-)RPKHPIKHQGLPQEV(L)(N)	1-16		X	X	X	X	X		
(-)RPKHPIKHQGLPQEV(L)(E)	1-17	X	X	X	X	X	X	X	
(-)RPKHPIKHQGLPQEV(L)(NENLL)(R)	1-21	X	X	X	X	X	X	X	
(H)QGLPQEV(L)(N)	9-16					X	X		X
(H)QGLPQEV(L)(E)	9-17			X	X	X	X		
(Q)EVLNENLLR(F)	14-22					X			
(L)NENLLR(F)	17-22						X		
(L)NENLLRF(F)	17-23		X						
(L)NENLLRFF(V)	17-24	X	X	X	X	X			
(L)RFFVAPFPEVF(G)	22-32				X	X	X		X
(L)RFFVAPFPEVFGK(E)	22-34		X						
(L)RFFVAPFPEVFGKE(K)	22-35		X		X		X		
(L)RFFVAPFPEVFGKEKVN(E)	22-38		X						X
(L)RFFVAPFPEVFGKEKVNEL(S)	22-40								X
(R)FFVAPFPEVF(G)	23-32		X		X	X			X
(F)FVAPFPE(V)	24-30					X	X		
(F)FVAPFPEVF(G)	24-32							X	
(F)FVAPFPEVFGKEKVN(E)	24-38	X	X		X	X	X		
(F)VAPFPEVF(G)	25-32								X
(F)VAPFPEVFGKE(K)	25-35			X		X			
(V)APFPEV(F)	26-31					X	X		
(A)PFPEVFGKE(K)	27-35						X		
(F)GKEKVNEL(S)	33-40				X	X	X		
(K)HIQKEDVPSERYL(G)	80-92					X	X		
(L)GYLEQLLR(L)	93-100	X	X	X	X	X	X		
(L)GYLEQLLR(L)(K)	93-101		X						
(L)GYLEQLLR(L)(K)(K)	93-102		X	X	X			X	
(L)GYLEQLLR(L)(K)(K)(Y)	93-103	X	X		X				
(L)GYLEQLLR(L)(K)(K)(Y)(K)	93-104		X						
(Y)LEQLLR(L)(K)(Y)	95-103		X						
(E)QLLR(L)(K)(K)	97-102	X	X						
(E)QLLR(L)(K)(K)(Y)(K)	97-104		X		X				
(E)QLLR(L)(K)(K)(Y)(K)(V)	97-105		X						

Résultats - Partie III

(L)KKYKVPQLEIVPN(S)	102-114					X	X		
(L)KKYKVPQLEIVPNSAEERLH(S)	102-121					X			X
(K)KYKVPQLEIVPN(S)	103-114					X			
(K)KYKVPQLEIVPNSAEERLH(S)	103-121				X		X		
(K)YKVPQLEIVPNSAEERLH(S)	104-121			X			X		
(Y)KVPQLEIVPN(S)	105-114					X	X		X
(Y)KVPQLEIVPNSAEERLH(S)	105-121					X			X
(K)VPQLEIVPN(S)	106-114								X
(K)VPQLEIVPNSAEERLH(H)	106-120						X		
(K)VPQLEIVPNSAEERLH(S)	106-121			X	X		X		X
(L)EIVPNSAEERLH(S)	110-121					X			X
(L)HSMKEGIHAQ(Q)	121-130				X	X	X		
(H)SMKEGIHAQ(Q)	122-130				X	X	X		X
(Q)QKEPMIGV(N)	131-138				X	X	X		X
(Q)QKEPMIGV(N)(Q)	131-139					X			
(Q)QKEPMIGVNQEL(A)	131-142		X	X	X	X	X		X
(Q)QKEPMIGVNQELA(Y)	131-143		X			X	X		X
(Q)QKEPMIGVNQELAY(F)	131-144	X	X	X		X	X		X
(Q)KEPMIGVNQEL(A)	132-142			X		X	X		X
(L)AYFYPELFRQ(F)	143-152						X		
(F)YPELFRQ(F)	146-152					X	X		X
(F)YQLDAYPS(G)	154-161					X			
(Y)QLDAYPS(G)	155-161								X
(L)GTQYTDAPSF(S)(D)	170-180								X
(Y)TDAPSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW(-)	174-199					X			X
(S)FSDIPNPIGS(E)	179-188					X			X
(S)FSDIPNPIGSENSE(K)	179-192						X		X
(S)FSDIPNPIGSENSEK(T)	179-193					X	X		X
(S)FSDIPNPIGSENSEKTTMPLW(-)	179-199			X		X			X
(S)DIPNPI(G)	181-186						X		X
(S)DIPNPIGSENSE(K)	181-192								X

Tableau 20. Peptides issus de l'hydrolyse de la caséine α_{s2} contenue dans 0,1 ou 0,01% de caséine entière, résultant de l'action pendant 1, 4 ou 22 h à pH 7 ou 6 à 37°C de la protéase PrtS soluble présente dans le surnageant de culture de *Streptococcus thermophilus* 4F44 (après 16 h de culture à 42°C dans le milieu YL + nickel + urée).

Les peptides ont été identifiés par spectrométrie de masse ESI –Q-TOF

		Caséine entière (m/v)							
		0,1%				0,01%			
		Temps d'hydrolyse							
		1 h	4 h	22 h	1 h	4 h	22 h	1 h	22 h
		pH d'hydrolyse							
(P _i) séquence (P' _i)	Fragments	7	6	7	6	7	6	7	7
(Y)LQYLYQGPIVLNPWDQVKRN(A)	96-115					X			
(Y)LYQGPIVLNPWDQVKRN(A)	99-115					X	X		
(Y)QGPIVLNPWDQVKR(R)	101-113			X	X	X	X		X
(Y)QGPIVLNPWDQVKR(N)	101-114	X	X	X	X	X	X		X
(Y)QGPIVLNPWDQVKRN(A)	101-115			X	X	X			X
(R)NAVPIPTPT(L)	115-122								X
(N)AVPIPTLN(N)	116-123	X		X	X	X	X		X
(N)AVPIPTLN(R)	116-124			X		X	X		
(T)LNREQLSTSEENSKK(T)	123-137					X			
(K)KTVDMESTEVEFTK(K)	137-149						X		
(K)KTVDMESTEVEFTKK(T)	137-150					X			
(K)TVDMESTEVEF(T)	138-147						X		
(K)TVDMESTEVEFTKK(T)	138-150					X			
(T)VDMESTEVEFTK(K)	139-149					X	X		
(T)VDMESTEVEFTKK(T)	139-150					X	X		
(E)VFTKKTCL(T)	146-153						X		
(E)VFTKKTCL(E)	146-154						X		
(F)TKKTKLTEEEKNRLN(F)	148-162						X		
(K)TKLTEEEKNRL(N)	150-161			X			X		
(K)TKLTEEEKN(R)	151-159					X			
(K)TKLTEEEKNRL(N)	151-161				X	X	X		X
(T)KLTEEEKNRL(N)	152-161	X		X	X	X			X
(T)KLTEEEKNRLNFK(K)	152-164			X					
(L)TEEEKNRLNFK(K)	154-164			X					
(N)RLNFK(K)	160-165					X			
(R)LNFK(K)	161-165			X	X	X	X		
(L)NFKK(I)	162-166			X			X		
(N)FLKKISQRY(Q)	163-171	X		X	X				
(N)FLKKISQRYQ(K)	163-172				X				
(L)KKISQRYQKF(A)	165-174	X	X	X	X		X	X	
(K)KISQRYQKF(A)	166-174	X	X	X	X		X	X	
(Y)QKFALPQ(Y)	172-178						X		
(Y)QKFALPQYL(K)	172-180			X	X			X	
(Q)KFALPQYL(K)	173-180		X					X	
(Q)KFALPQYLK(T)	173-181	X	X	X	X			X	
(Q)KFALPQYLKT(V)	173-182		X	X					
(K)FALPQYLK(T)	174-181			X			X		
(K)FALPQYLKT(V)	174-182						X		
(F)ALPQYLK(T)	175-181		X			X			

Résultats - Partie III

(F)ALPQYLKT(V)	175-182					X			
(A)LPQYLK(T)	176-181			X	X	X	X		X
(A)LPQYLKT(V)	176-182						X		
(Q)YLKTVYQHQA(A)	179-188		X		X				
(Q)YLKTVYQHQA(M)	179-189	X		X	X		X		
(H)QKAMKPWIQPK(T)	187-197	X		X	X				
(K)AMKPWIQPK(T)	189-197	X	X	X	X	X	X	X	
(K)AMKPWIQPK(T)	189-198	X		X	X	X	X		
(K)AMKPWIQPKTK(V)	189-199	X	X	X		X	X	X	X
(A)MKPWIQPK(T)	190-197		X	X	X				
(A)MKPWIQPKTK(K)	190-198	X		X	X	X	X		
(A)MKPWIQPKTK(V)	190-199	X	X	X	X	X	X	X	
(M)KPWIQPK(T)	191-197			X		X	X		X
(M)KPWIQPKTK(K)	191-198			X		X	X		
(M)KPWIQPKTK(V)	191-199	X		X	X	X	X		X
(K)PWIQPK(T)	192-197	X		X	X		X		
(K)PWIQPKTK(V)	192-199	X							
(K)TKVIPYV(R)	198-204	X		X	X	X	X		
(K)TKVIPYV(R)	198-205	X							
(K)TKVIPYVRYL(-)	198-207	X	X	X	X		X		
(T)KVIPYVRYL(-)	199-207	X	X	X				X	
(K)VIPYV(R)	200-205			X		X	X		
(V)IPYVRYL(-)	201-207	X	X	X			X		

Tableau 21. Peptides issus de l'hydrolyse de la caséine κ contenue dans 0,1 ou 0,01% de caséine entière, résultant de l'action pendant 1, 4 ou 22 h à pH 7 ou 6 à 37°C de la protéase PrtS soluble présente dans le surnageant de culture de *Streptococcus thermophilus* 4F44 (après 16 h de culture à 42°C dans le milieu YL + nickel + urée).

Les peptides ont été identifiés par spectrométrie de masse ESI-Q-TOF.

		Caséine entière (m/v)							
		0,1%				0,01%			
		Temps d'hydrolyse							
		1 h	4 h	22 h	1 h	4 h	22 h	1 h	22 h
		pH d'hydrolyse							
(P _i) séquence (P' _i)	Fragments	7	6	7	6	7	6	7	7
(A)KYIPIQY(V)	24-30				X	X	X		
(A)KYIPIQYVL(S)	24-32	X	X	X	X			X	
(A)KYIPIQYVLS(R)	24-33	X	X	X	X	X			
(Y)IPIQYVLS(R)	26-33			X	X	X	X		X
(L)INNQFLPYPYAKPA(A)	51-65						X		
(I)NNQFLPYP(Y)	52-59	X	X						
(N)NQFLPYPY(Y)	53-60					X			
(N)QFLPYPYAKPA(A)	54-65				X				
(Q)FLPYPYAKPA(A)	55-65					X			
(A)AVRSPAQIL(Q)	66-74			X		X	X		
(A)VRSPAQIL(Q)	67-74								X
(A)QILQWQVL(S)	72-79								X
(L)QWQVLS(D)	75-80				X				
(M)ARHPHPLS(F)	96-104					X			

Tableau 22. Nombre de fragments peptidiques issus de l'hydrolyse des caséines α_{s1} , α_{s2} , β et κ de la caséine entière bovine par la protéase PrtS soluble présente dans le surnageant de culture de *Streptococcus thermophilus* 4F44 cultivée 16 h à 42°C dans un milieu YL + nickel + urée.

Ce milieu contenant la protéase libre est ajouté à une solution de caséine entière (à 0,1% ou 0,01% (m/v) dissoute dans du tampon Tris HCl 50 mM pH 7 ou dans du tampon 50 mM MES NaOH pH 6. Cette hydrolyse effectuée à 37°C a été suivie pendant 1, 4 et 22 h.

Caséines	Caséine entière							
	0,1%						0,01%	
	Temps d'hydrolyse							
	1 h		4 h		22 h		1 h	22 h
Caséines	pH d'hydrolyse							
	7	6	7	6	7	6	7	7
α_{s1}	10	24	18	22	40	38	5	31
α_{s2}	22	15	36	26	30	37	9	11
β	61	49	86	90	97	100	41	61
κ	3	3	4	6	7	4	1	3

Tableau 23. Tailles moyennes de fragments peptidiques issus de l'hydrolyse des caséines α_{s1} , α_{s2} , β et κ obtenus après hydrolyse de la caséine entière bovine par le surnageant de culture de *Streptococcus thermophilus* 4F44 contenant la protéase PrtS soluble cultivée 16 h à 42°C dans un milieu YL + nickel + urée.

La déviation standard est mentionnée entre parenthèse.

Ce milieu contenant la protéase libre est ajouté à une solution de caséine entière (à 0,1% ou 0,01% (m/v) dissoute dans du tampon Tris HCl 50 mM pH7 ou dans du tampon 50 mM MES NaOH pH6. Cette hydrolyse effectuée à 37°C a été suivie pendant 1, 4 et 22 h.

Caséines	Caséine entière								
	0,1%						0,01%		
	Temps d'hydrolyse								
	1 h		4 h		22 h		1 h		22 h
Caséines	pH d'hydrolyse								
	7	6	7	6	7	6	7	7	
α_{s1}	12,7 (4,6)	11,9 (3,7)	13,1 (4,3)	12,1 (3,9)	12,0 (4,5)	11,8 (3,9)	14,0 (5,0)	12,4 (4,7)	
α_{s2}	9,2 (1,7)	9,4 (1,7)	9,2 (2,4)	9,5 (2,3)	10,3 (3,5)	9,4 (2,7)	9,3 (0,9)	10,2 (2,9)	
β	14,9 (7,7)	14,3 (6,8)	13,1 (6,6)	13,9 (6,9)	11,9 (6,5)	12,8 (6,4)	11,7 (5,7)	11,0 (6,1)	
κ	9 (1,0)	9 (1,0)	9 (0,8)	8,7 (2,2)	8,9 (1,4)	9,8 (3,6)	9 -	8 (0)	

Les fragments peptidiques obtenus à partir de l'hydrolyse de la caséine β sont légèrement plus courts après 22 h qu'après 4 h, pour exemple :

- CN β -(f106-125) à 4 h \rightarrow CN β -(f107-119) à 22 h,
- CN β -(f133-154) à 4 h \rightarrow CN β -(f134-142/143/144/154) à 22 h,
- CN β -(f134-160) à 4 h \rightarrow CN β -(f135-140/142/143/144), CN β -(f136-141), CN β -(f137-141), CN β -(f138-143), CN β -(f139-154) et CN β -(f139-160) à 22 h,
- CN β -(f156-165) à 4 h \rightarrow CN β -(f158-165) à 22 h,
- CN β -(f169-182) à 4 h \rightarrow CN β -(f171-175) à 22 h,
- CN β -(f199-208) à 4 h \rightarrow CN β -(f203-209) à 22 h.

La taille moyenne des peptides ne varie pas de manière significative entre 4 h et 22 h. Par contre certains peptides de grande taille disparaissent, ils peuvent être générés à des temps courts, puis ensuite digérés pour donner des peptides de taille inférieure, qui peuvent parfois ne pas être détectés.

Chaque caséine présente des zones de résistance à l'hydrolyse (Tableaux 18, 19, 20 et 21 ; Figures 45, 46, 47 et 48). Les caséines α_{s2} et β présentent peu ou pas de fragment(s) peptidique(s) issu(s) de l'hydrolyse de la partie N-terminale. Pour la caséine α_{s2} , aucun fragment de la région 1-95 n'a été détecté quelles que soient les conditions d'hydrolyse. Concernant la caséine β , la région 1-50 est peu hydrolysée, des fragments sont générés essentiellement après le temps long d'hydrolyse de 22 h. Quant à la caséine α_{s1} , elle montre une résistance à l'hydrolyse dans la région 40-80 (aucun peptide de cette région n'a été détecté) pour toutes les conditions d'hydrolyse. Pour la caséine κ qui est la caséine la moins hydrolysée, aucun fragment issu de l'hydrolyse des régions N-terminale (f1-23) et C-terminale (f105-169) n'a été détecté, il est intéressant de souligner que le CMP/GMP (f106-169) semble intact.

Quand la caséine entière est utilisée à une concentration 10 fois moins importante, l'hydrolyse majeure est aussi dirigée vers la caséine β . Dans ces conditions le nombre de fragments issus de cette caséine passe de 41 après 1 h d'hydrolyse à 61 après 22 h. (Tableau 22), de plus la différence de taille des fragments n'est pas significative entre les deux temps d'hydrolyse (Tableau 23).

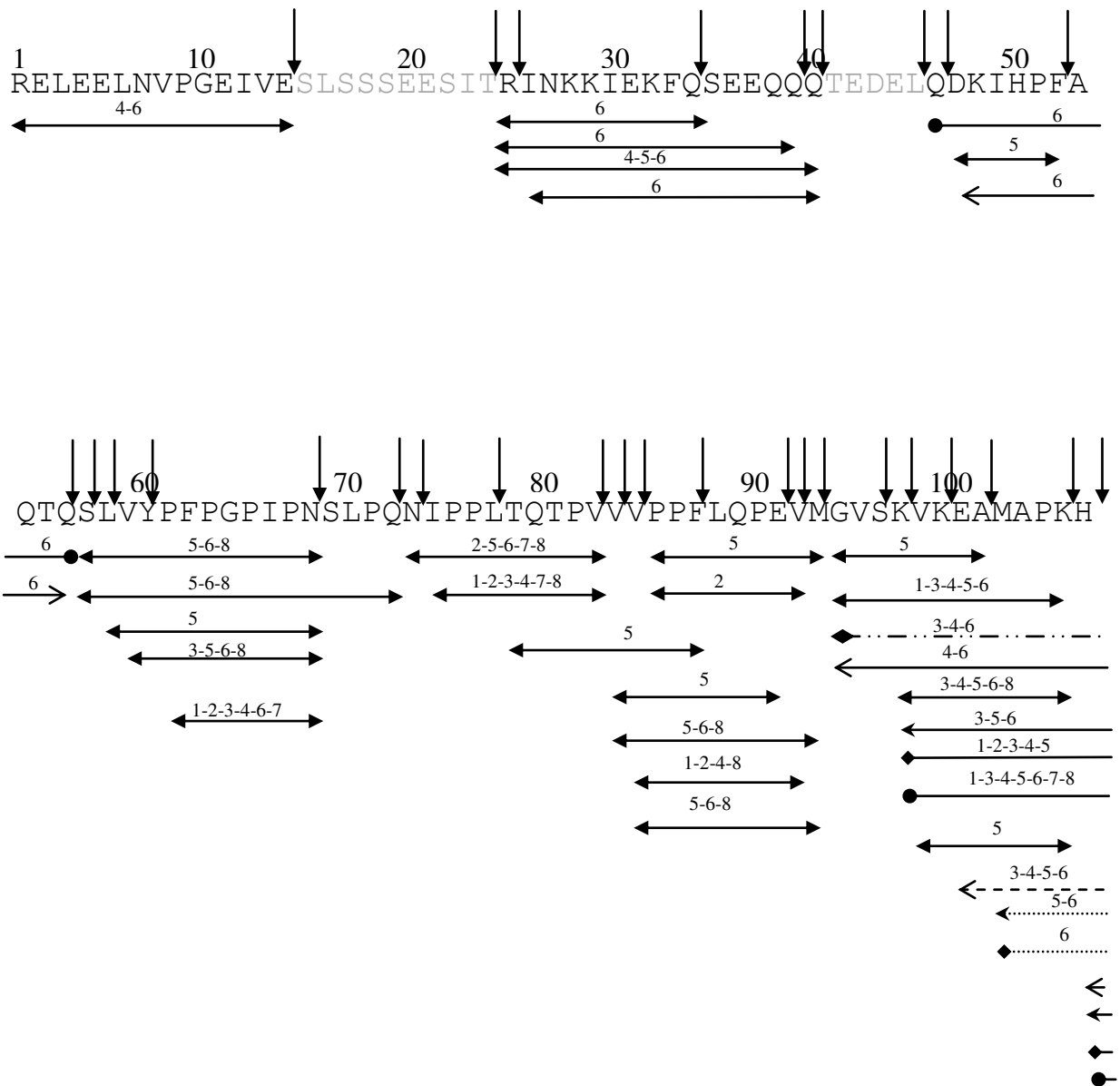


Figure 45 : partie 1/3

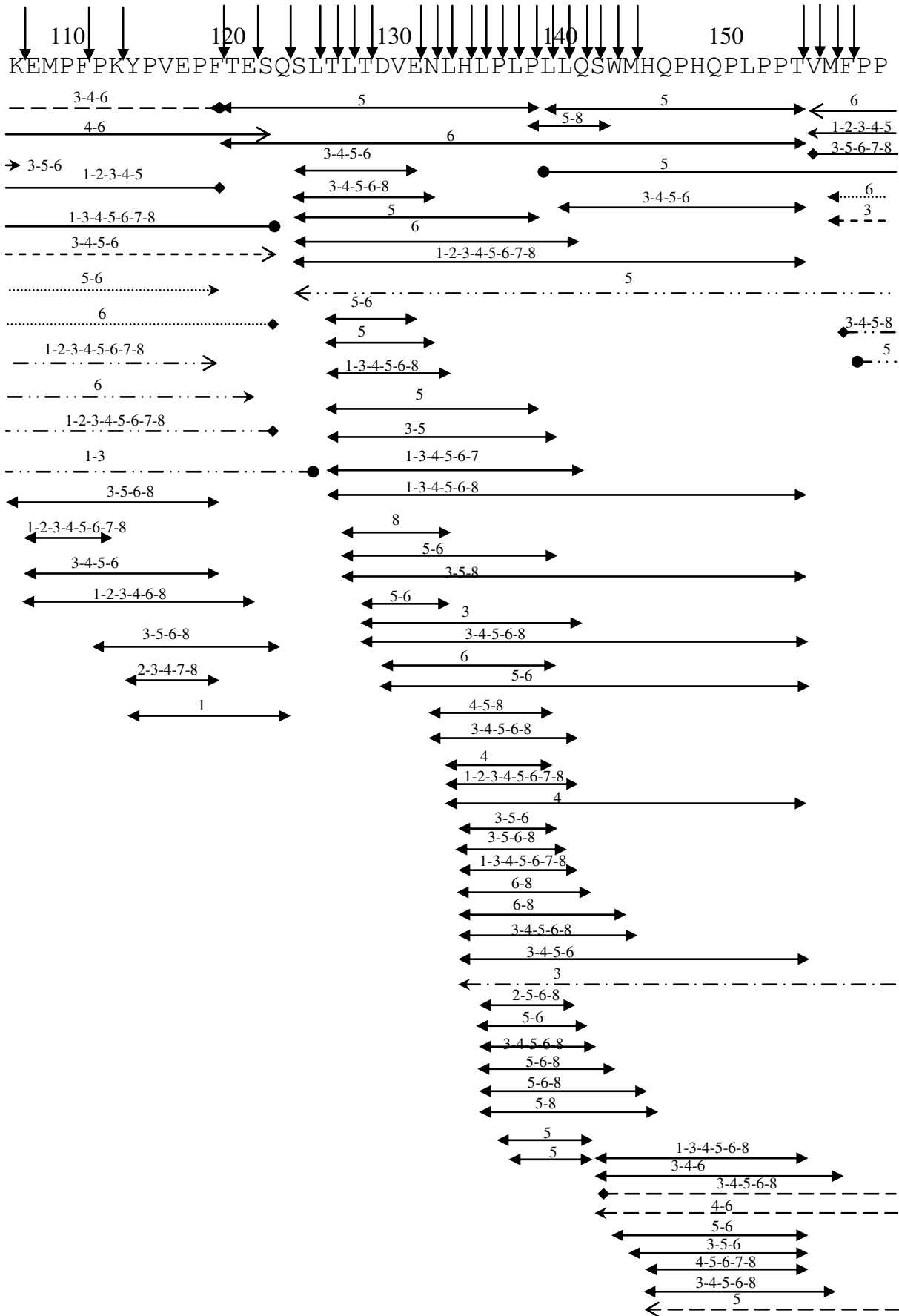


Figure 45 : partie 2/3

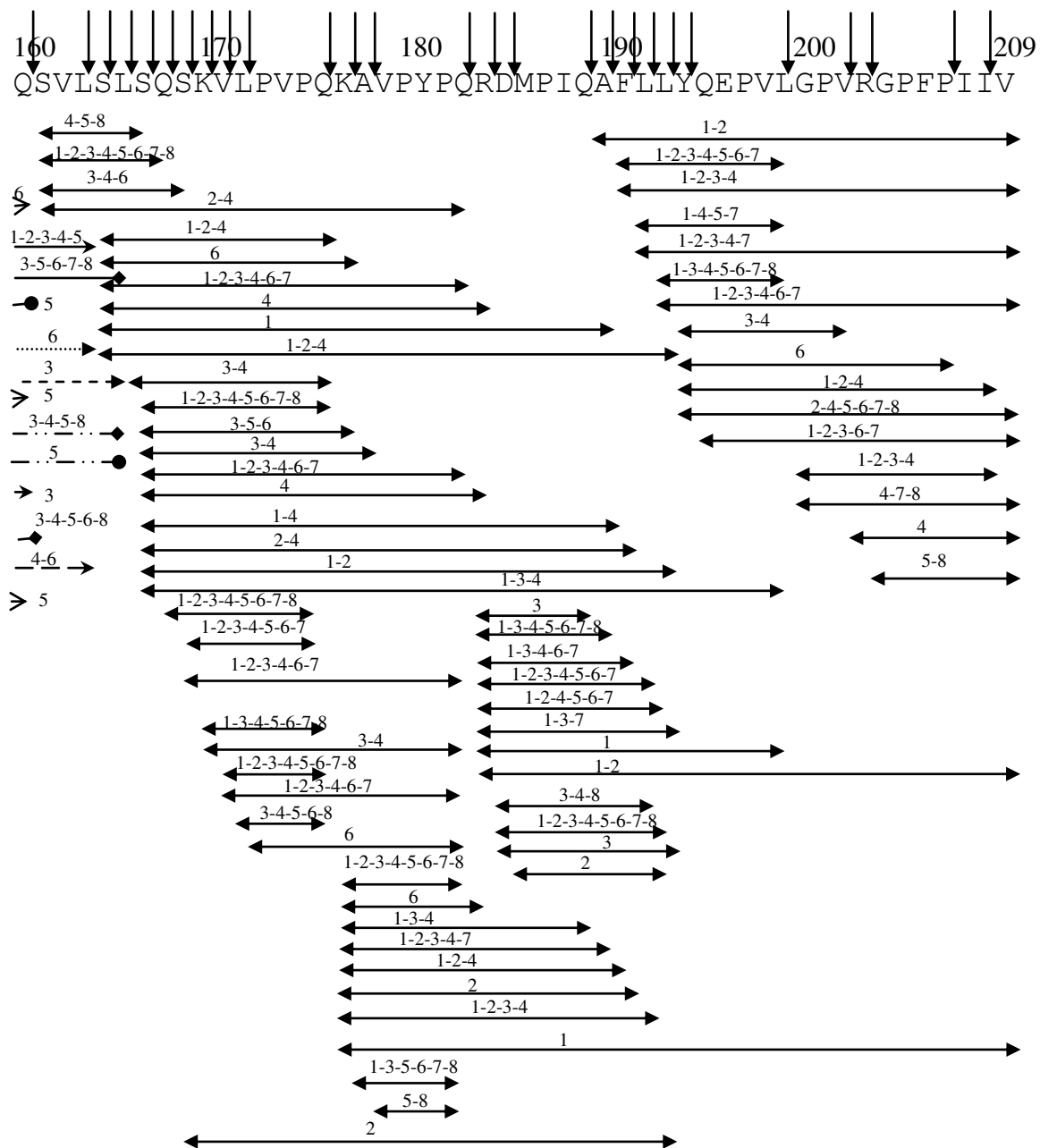


Figure 45. Localisation sur la séquence de la caséine β variant A2 des peptides résultant de l'action durant 1, 4 ou 22 h de la protéase PrtS soluble de *Streptococcus thermophilus* 4F44 contenue dans le surnageant de culture placée dans un tampon Tris 50 mM pH 7 ou MES 50 mM pH 6 en présence de caséine entière à 0,1% ou 0,01% (m/v).

Les flèches verticales indiquent les liaisons hydrolysées et les flèches horizontales les peptides libérés.

Hydrolyse à pH 7 pendant 1 h, 4 h et 22 h caséine 0,1% : (1, 3, 5) ; caséine 0,01% pendant 1 h et 22 h : (7, 8) ; Hydrolyse à pH 6 pendant 1 h, 4 h et 22 h caséine 0,1% : (2, 4, 6)

Ces peptides ont été identifiés par spectrométrie de masse ESI-Q-TOF.

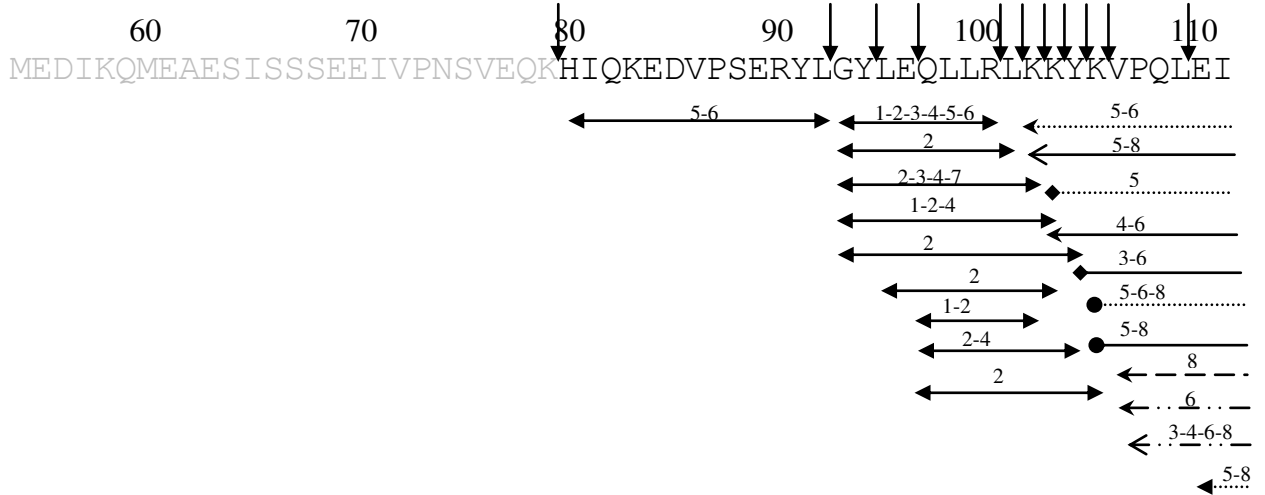
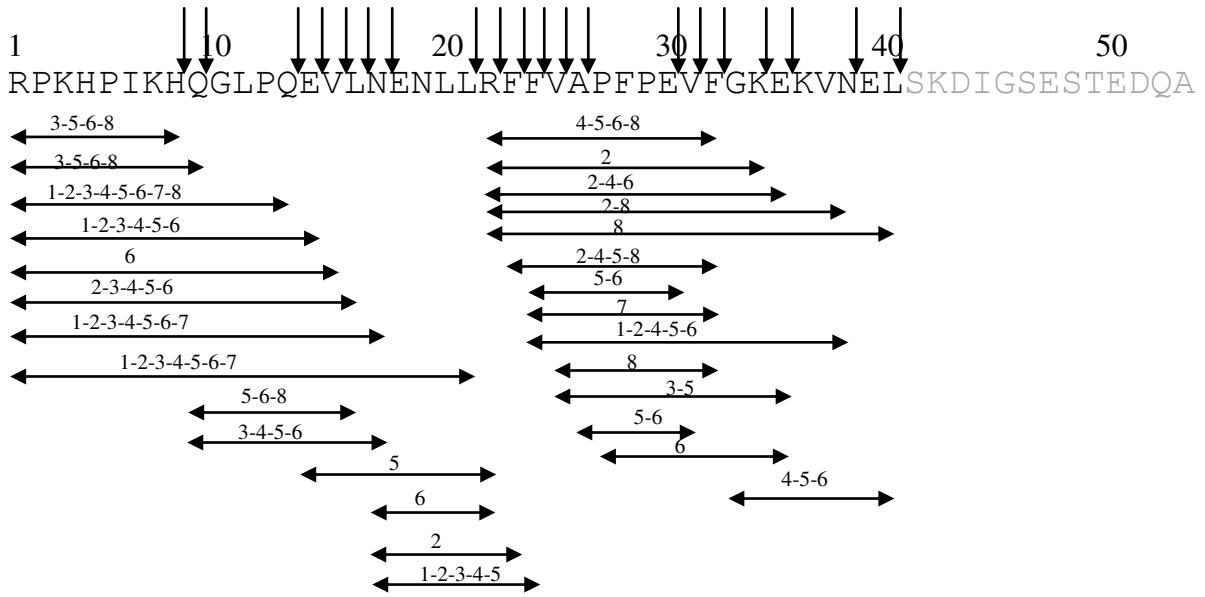


Figure 46 : partie 1/2

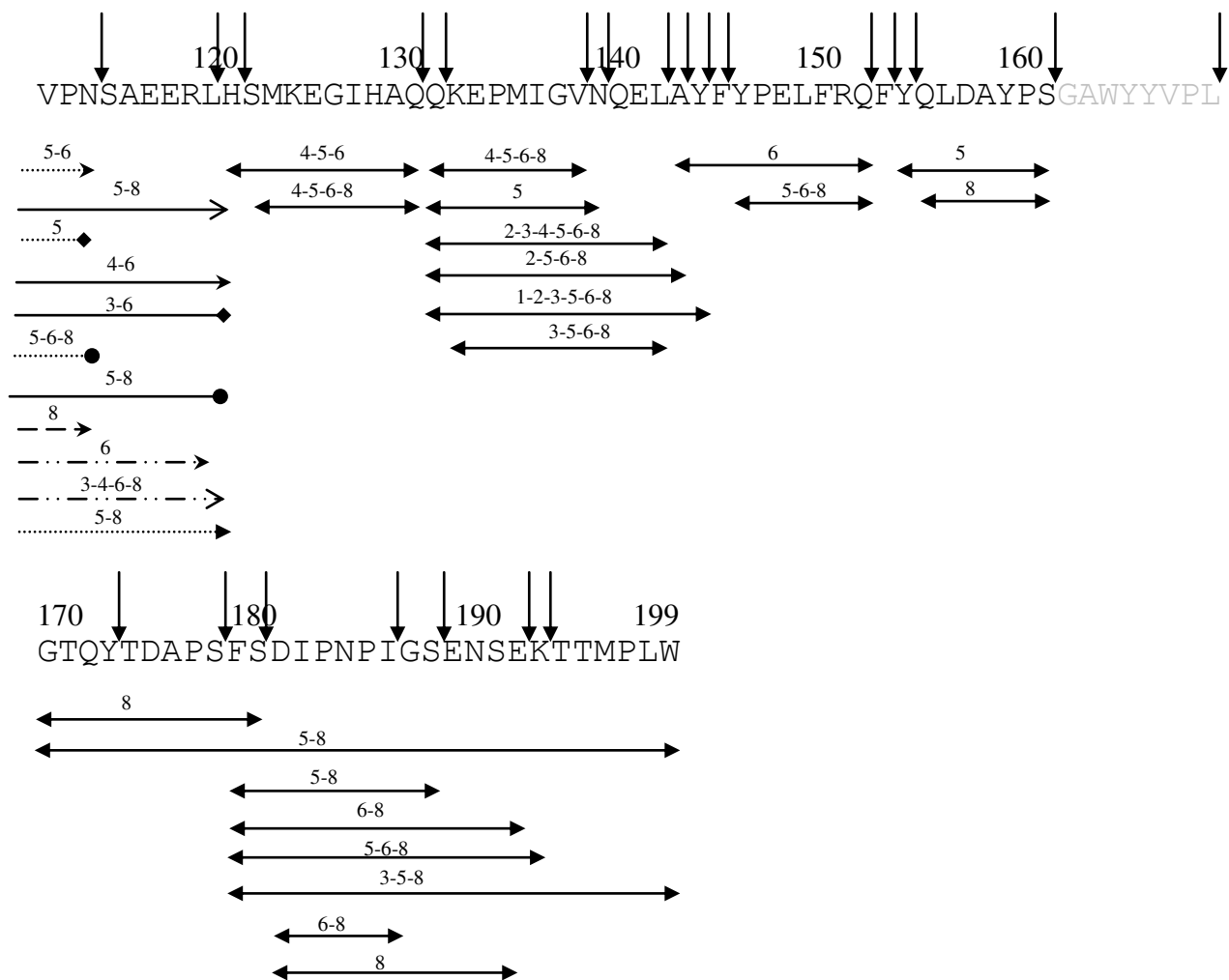


Figure 46. Localisation sur la séquence de la caséine α_1 variant B des peptides résultant de l'action durant 1, 4 ou 22 h du surnageant de culture, contenant la protéase PrtS soluble de *Streptococcus thermophilus* 4F44, placé dans un tampon Tris 50 mM pH 7 ou MES 50 mM pH 6 en présence de caséine entière à 0,1% ou 0,01% (m/v).

Les flèches verticales indiquent les liaisons hydrolysées et les flèches horizontales les peptides libérés.

Hydrolyse à pH 7 pendant 1 h, 4 h et 22 h caséine 0,1% : (1, 3, 5) ; caséine 0,01% pendant 1 h et 22 h : (7, 8) ; Hydrolyse à pH 6 pendant 1 h, 4 h et 22 h caséine 0,1% : (2, 4, 6)

Ces peptides ont été identifiés par spectrométrie de masse ESI-Q-TOF.

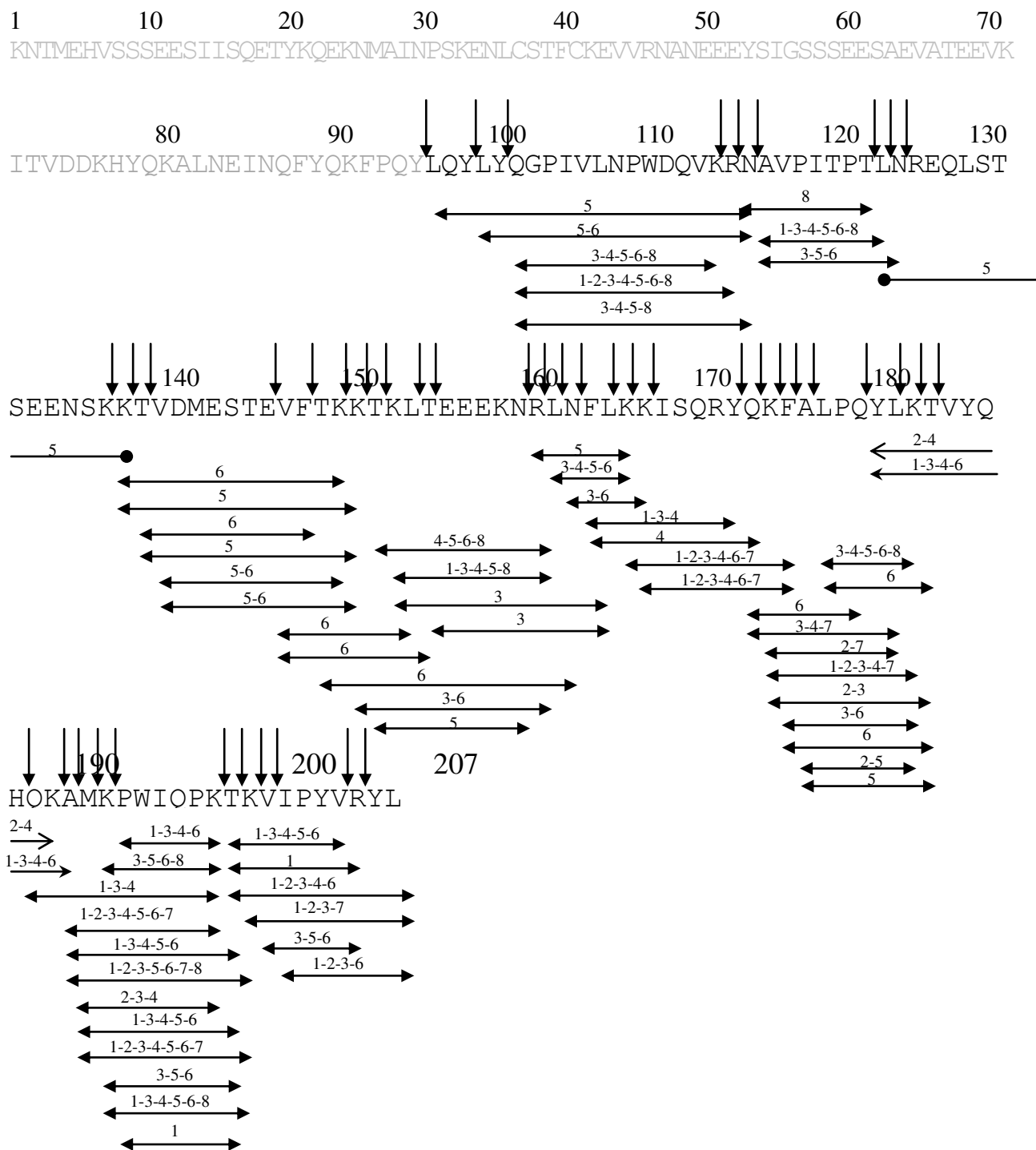


Figure 47. Localisation sur la séquence de la caséine α_{s2} variant A des peptides résultant de l'action durant 1, 4 ou 22 h du surnageant de culture, contenant la protéase PrtS soluble de *Streptococcus thermophilus* 4F44, placé dans un tampon Tris 50 mM pH 7 ou MES 50 mM pH 6 en présence de caséine entière à 0,1% ou 0,01% (m/v).

Les flèches verticales indiquent les liaisons hydrolysées et les flèches horizontales les peptides libérés. Hydrolyse à pH 7 pendant 1 h, 4 h et 22 h caséine 0,1% : **(1, 3, 5)** ; caséine 0,01% pendant 1 h et 22 h : **(7, 8)** ; Hydrolyse à pH 6 pendant 1 h, 4 h et 22 h caséine 0,1% : **(2, 4, 6)**

Ces peptides ont été identifiés par spectrométrie de masse ESI-Q-TOF.

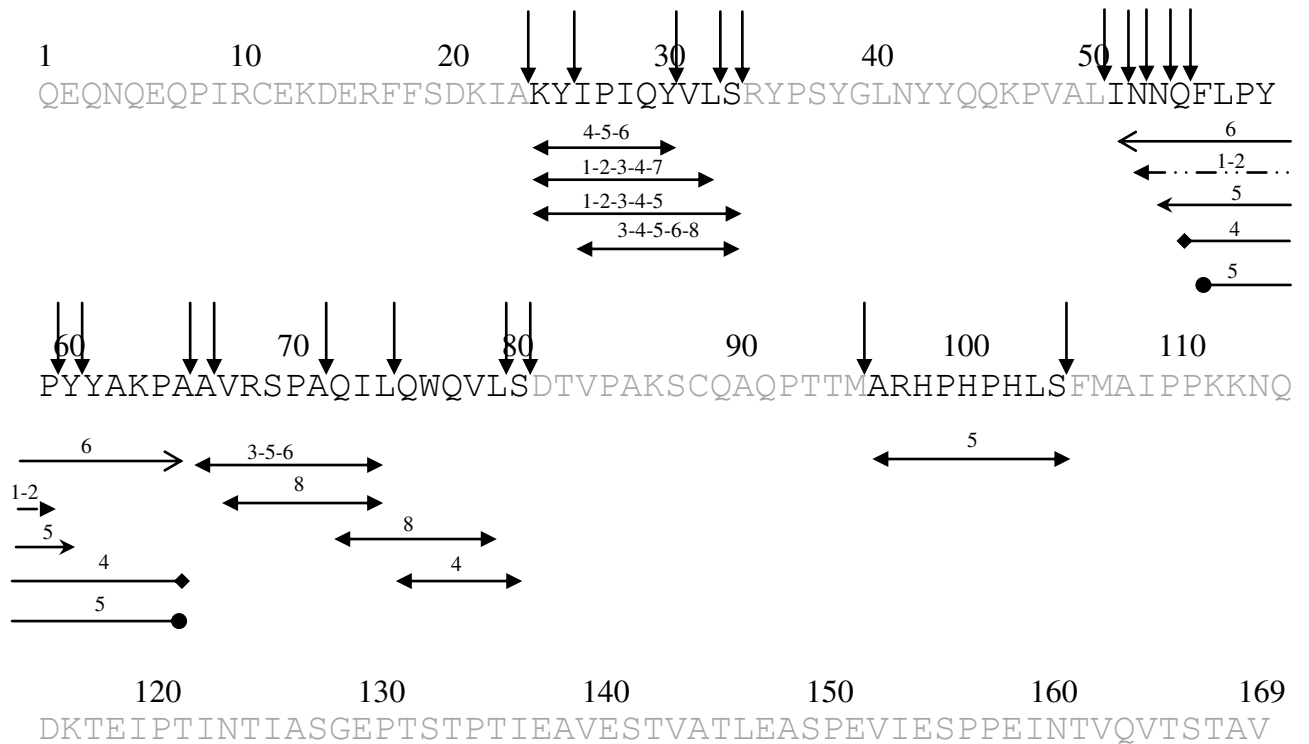


Figure 48. Localisation sur la séquence de la caséine κ variant A des peptides résultant de l'action durant 1, 4 ou 22 h du surnageant de culture, contenant la protéase PrtS soluble de *Streptococcus thermophilus* 4F44, placé dans un tampon Tris 50 mM pH 7 ou MES 50 mM pH 6 en présence de caséine entière à 0,1% ou 0,01% (m/v).

Les flèches verticales indiquent les liaisons hydrolysées et les flèches horizontales les peptides libérés.

Hydrolyse à pH 7 pendant 1 h, 4 h et 22 h caséine 0,1% : (1, 3, 5) ; caséine 0,01% pendant 1 h et 22 h : (7, 8) ; Hydrolyse à pH 6 pendant 1 h, 4 h et 22 h caséine 0,1% : (2, 4, 6)

Ces peptides ont été identifiés par spectrométrie de masse ESI-Q-TOF.

2.4. Spécificité de coupure de la protéase PrtS libre

L'étude de l'ensemble des peptides générés à partir des caséines α_{s1} , α_{s2} , β et κ par la protéase PrtS soluble contenue dans le milieu de culture peut permettre de proposer une spécificité de coupure de cette protéase.

2.4.1. Comparaison des sites de coupure observés avec ceux du fragment 1-23 et de la caséine α_{s1} obtenus avec d'autres protéases de bactéries lactiques

Cette étude nécessite d'analyser les résidus d'acides aminés en position carboxy-terminale (résidu P_1) et amino-terminale (résidu P'_1) par rapport à la liaison clivée selon la nomenclature de Schechter et Berger, 1967 (Figure 49).

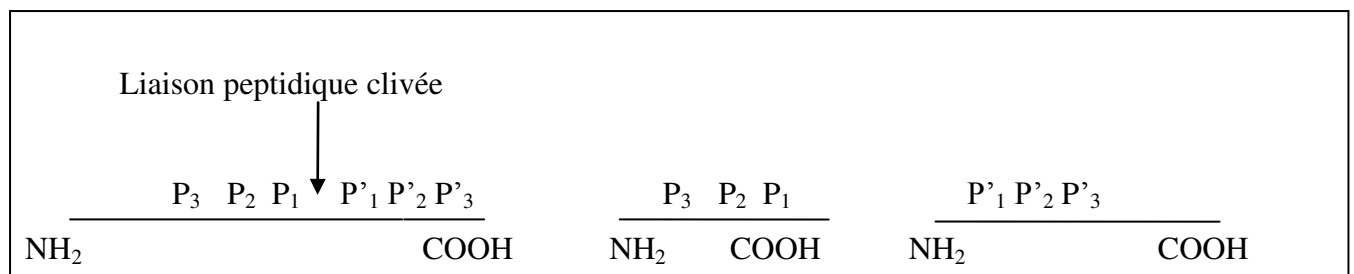


Figure 49. Liaison peptidique hydrolysée en position P_1 - P'_1 selon la nomenclature de Schechter et Berger (1967).

L'étude des résidus P_3 , P_2 , P'_2 , P'_3 pourrait également s'avérer utile. En 2000, Fernandez-Espla *et al.* ont étudié la spécificité de la protéase PrtS purifiée à partir de la souche CNRZ 385 sur 7 substrats chromogènes de type paranitroanilide et sur le fragment $\text{CN}\alpha_{s1}$ -(f1-23). L'utilisation de ce peptide permet de comparer les sites d'hydrolyse de la protéase PrtS pure avec ceux qui ont été observés, dans nos conditions expérimentales, sur la caséine α_{s1} . Sur le fragment $\text{CN}\alpha_{s1}$ -(f1-23), Fernandez-Espla *et al.* (2000) ont montré que la protéase PrtS clive très rapidement, à pH 8,0, les liaisons Leu^{16} - Asn^{17} et Asn^{17} - Glu^{18} . En comparaison, la vitesse d'hydrolyse des liaisons ^8His - Gln^9 et ^9Gln - Gly^{10} est légèrement plus faible. De plus, la liaison peptidique ^{13}Gln - Glu^{14} est clivée beaucoup plus lentement et la liaison ^{21}Leu - Arg^{22} est celle dont la cinétique d'hydrolyse est la plus lente.

Dans notre cas, ces liaisons de la caséine α_{s1} , contenues dans la région 1-23, qui ont été clivées par la protéase PrtS dans nos conditions d'hydrolyse sont ^{13}Gln - Glu^{14} , ^{16}Leu - Asn^{17} , ^{17}Asn - Glu^{18} et ^{21}Leu - Arg^{22} à partir d'une heure d'hydrolyse à pH 6 ou 7, et ^8His - Gln^9 , ^9Gln - Gly^{10} , après 4 h et 22 h d'incubation à pH 6 ou 7 (Figure 50).

Espèces	Caséine α_{s1} (f1-23)				
	5	10	15	20	
	R P K H P I K H Q G L P Q E V L N E N L L R F				
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> CRL 581		↑	↑↑	↑	↑
<i>Lb. helveticus</i> CNRZ32 (PrTH)				↑↑	
<i>Lb. helveticus</i> CNRZ32 (PrTH2)	↑	↑			
<i>Lb. helveticus</i> CNRZ303	↑	↑			
<i>Lb. helveticus</i> CP790	↑	↑			
<i>Lb. helveticus</i> L89		↑↑	↑	↑↑	↑
<i>Lc. lactis</i> HP (PrtPI)					
	pH 6,5	↑↑	↑	↑↑	↑
	pH 5,2		↑	↑↑	↑
<i>Lc. lactis</i> AM1 (PrtPIII)					
	pH 6,5 et pH 5,2		↑	↑↑	↑
<i>S. thermophilus</i> CNRZ385 (PrTS)					
	pH 8,0	↑↑	↑	↑↑	↑
	pH 5,2			↑↑	↑

Présent travail

<i>S. thermophilus</i>		Caséine α_{s1}				
4F44	pH 7	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
	1 h			↑↑	↑↑	↑
	4 h	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑
	22 h	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
4F44	pH 6	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
	1 h			↑↑	↑↑	↑↑
	4 h	↑		↑↑	↑↑	↑↑
	22 h	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑

Figure 50. Spécificité de coupure du fragment (1-23) de la caséine α_{s1} pour différentes bactéries lactiques comparée aux sites de coupure obtenus lors de l'hydrolyse (d'1 h, 4 h ou 22 h) de la caséine α_{s1} par le surnageant de culture YL contenant la protéase PrtS soluble après une croissance d'une nuit de *Streptococcus thermophilus* 4F44.

La flèche indique un site de coupure.

L. delbrueckii subsp. *lactis* CRL 581 (Hebert *et al.*, 2008), *L. helveticus* CNRZ32 (Pederson *et al.*, 1999), *L. helveticus* CNRZ 303 (Zevaco and Gripon, 1988), *L. helveticus* CP790 (Ono *et al.*, 1997), *L. helveticus* L89 (Martin-Hernandez *et al.*, 1994), *Lc. lactis* HP (Exterkate et Alting, 1999), *Lc. lactis* HP (Exterkate et Alting, 1999), *Lc. lactis* AM1 (Exterkate *et al.*, 1991) et *S. thermophilus* CNRZ385 (Fernandez-Espla *et al.*, 2000).

Par rapport aux travaux de Fernandez-Espla *et al.* (2000), trois liaisons supplémentaires $^{14}\text{Glu}-\text{Val}^{15}$, $^{15}\text{Val}-\text{Leu}^{16}$ et $^{22}\text{Arg}-\text{Phe}^{23}$ de la région 1-23 de la caséine α_{s1} , ont été clivées.

L'hydrolyse de la liaison $^{14}\text{Glu}-\text{Val}^{15}$, est trouvée dans toutes les conditions d'hydrolyse, et lors de l'hydrolyse du fragment $\text{CN}\alpha_{s1}\text{-(f1-23)}$ par *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581 (Figure 50).

La liaison $^{15}\text{Val}-\text{Leu}^{16}$ n'est clivée que dans les seules conditions d'hydrolyse à pH 6 pendant 22 h. Ce clivage n'a été retrouvé ni avec une protéase d'une autre bactérie lactique (Figure 50) ni avec le système protéolytique extracellulaire des souches de *S. thermophilus* (Miclo *et al.*, 2011 soumis). Pour le suivi de la caséinolyse, Miclo *et al.*, ont choisi différentes souches de *S. thermophilus* (ayant une activité protéolytique de surface) en phase exponentielle de croissance. Ces bactéries ont été placées dans un tampon phosphate contenant des caséines, des prélèvements ont été réalisés au cours du temps et la masse des peptides générés a été déterminée par spectrométrie de masse.

Il faut noter que l'hydrolyse de la liaison $^{22}\text{Arg}-\text{Phe}^{23}$ n'a pas été mise en évidence dans le travail (Fernandez-Espla *et al.*, 2000) portant sur la protéase PrtS pure avec le peptide $\text{CN}\alpha_{s1}\text{-(f1-23)}$. En revanche, l'hydrolyse de cette liaison a été constatée dans le travail portant sur l'hydrolyse de la $\text{CN}\alpha_{s1}$ par le système protéolytique extracellulaire de diverses souches de *S. thermophilus* (Miclo *et al.*, 2011 soumis). Cette liaison est la dernière liaison peptidique du peptide $\text{CN}\alpha_{s1}\text{-(f1-23)}$ et son hydrolyse devrait donc mettre en jeu une activité de type exopeptidasique. L'activité endopeptidasique de la protéase PrtS a pu s'exprimer sur la liaison $^{22}\text{Arg}-\text{Phe}^{23}$ de la caséine α_{s1} mais pas sur celle du peptide $\text{CN}\alpha_{s1}\text{-(f1-23)}$.

Compte-tenu de ces observations, l'activité soluble relève bien d'une protéase de type PrtS.

2.4.2. Spécificité de coupure de la protéase PrtS libre déduite des peptides issus de l'hydrolyse de la caséine entière.

Il a été préalablement montré que toutes les régions des caséines α_{s1} , α_{s2} , β et κ ne sont pas protéolysées avec la même efficacité. L'utilisation de la caséine entière a permis de limiter cet inconvénient grâce à la répartition plus homogène des différents résidus constitutifs même si les diverses caséines ne sont pas dans les mêmes concentrations. Pour déterminer la spécificité de coupure, nous avons dû répertorier l'ensemble des résidus en position P_1 des liaisons clivées.

L'obtention de ces résidus a pu être analysée de deux manières :

- l'accès le plus simple a consisté à vérifier la nature du résidu C-terminal de tous les peptides caractérisés. La présence d'un peptide donné a été considérée comme mettant en évidence une hydrolyse avérée par la protéase de la liaison impliquant le résidu P_1 .

- le deuxième accès est quant à lui indirect : l'analyse du résidu en position N-terminale des peptides caractérisés permet de connaître les résidus P₁ des liaisons peptidiques clivées. Ensuite, en analysant la séquence protéique, il est alors possible de déterminer le résidu P₁ de la liaison clivée.

Le nombre de liaisons clivées en position P₁ pour chaque type de résidu ainsi que le pourcentage par rapport au nombre du même résidu contenu dans la caséine β (Tableaux 24 et 25), la caséine α_{s1} (Tableaux 26 et 27), la caséine α_{s2} (Tableaux 28 et 29), et la caséine κ (Tableaux 30 et 31) pour chaque temps d'hydrolyse (1 h, 4 h, et 22 h) à pH 7 (Tableaux 24, 26, 28 et 30) et à pH 6 (Tableaux 25, 27, 29 et 31) nous ont permis de déterminer qu'il existe une spécificité de la protéase PrtS vis-à-vis du résidu en position P₁ de la liaison clivée.

Quand le pourcentage de chaque résidu en position P₁ par rapport au nombre de résidus total de ce type, composant chaque caséine, est supérieur à 25%, ce résidu est arbitrairement considéré comme préférentiel pour l'hydrolyse. Ces résidus préférentiels permettront de déterminer la spécificité de coupure de PrtS pour chaque caséine et chaque condition d'hydrolyse.

2.4.2.1. Caséine β

Concernant la caséine β , la plus dégradée, la protéase PrtS hydrolyserait après 1 h (à pH 6 ou à pH 7) les liaisons peptidiques ayant en position P₁ les résidus : Leu, Tyr, Asn, Gln, Arg et Lys. A partir de 4 h d'hydrolyse, d'autres résidus préférentiels s'ajoutent : Ala, Met, Ser, Trp (à pH 7 seulement) et, Phe, Val et His (seulement à pH 6). Le résidu Thr est lui aussi spécifique à la protéase après 22 h d'hydrolyse (Tableaux 24 et 25).

Pour la caséine β , quand l'ensemble des conditions est rassemblé, les résidus préférentiels en position P₁ présentant plus de 50% de liaisons clivées sont Ala, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Asn, Gln, Arg et Lys, et ceux présentant plus de 35% sont Val, Ser, Thr et His (Tableau 32).

2.4.2.2. Caséine α_{s1}

Quant à la caséine α_{s1} , après 1 h d'hydrolyse, le nombre de liaisons clivées à pH 6 est supérieur à celui obtenu à pH 7. Les résidus préférentiels sont Phe et Asn à pH 7, et Leu, Phe, Tyr, Asn, Arg et Lys à pH 6. A ce dernier pH, des résidus préférentiels s'ajoutent à partir de 4 h d'hydrolyse (Gln, His) et après 22 h (Val). (Tableaux 26 et 27).

Pour la caséine α_{s1} , quand l'ensemble des conditions est rassemblé, les résidus préférentiels en position P₁ présentant soit plus de 50% de liaison clivées sont Leu, Phe, Tyr, et soit plus de 35% sont Val, Gln, Arg, His et Lys (Tableau 32).

Tableau 24. Spécificité de coupure de l'activité protéolytique contenue dans le surnageant de milieu de culture de *Streptococcus thermophilus* 4F44 (milieu YL + nickel + urée, après 16 h à 42°C) vis-à-vis du résidu P1 de la liaison peptidique clivée de la caséine β (0,1%) à pH 7 après 1 h, 4 h et 22 h d'hydrolyse à 37°C.

L'hydrolyse en position P1 d'une liaison peptidique a été avérée quand le peptide présentant le résidu P1 en position carboxy terminale est retrouvé et/ou l'autre peptide généré présentant à son extrémité aminoterminal le résidu en position P'1.

Hydrolyse de la caséine β (0,1%) à pH 7							
Résidus en position P ₁	Nombre de résidus dans la protéine	Temps d'hydrolyse 1 h		Temps d'hydrolyse 4 h		Temps d'hydrolyse 22 h	
		Nombre d'hydrolyses après ce résidu	% par rapport au nombre de résidus de ce type	Nombre d'hydrolyses après ce résidu	% par rapport au nombre de résidus de ce type	Nombre d'hydrolyses après ce résidu	% par rapport au nombre de résidus de ce type
Résidus hydrophobes							
Ala (A)	5	1	20,0	2	40,0	3	60,0
Ile (I)	10	1	10,0	1	10,0	0	0,0
Leu (L)	22	7	31,8	11	50,0	14	63,6
Met (M)	6	1	16,7	3	50,0	3	50,0
Phe (F)	9	2	22,2	3	33,3	6	66,6
Tyr (Y)	4	2	50,0	2	50,0	0	0,0
Trp (W)	1	0	0,0	1	100,0	1	100,0
Val (V)	18	3	16,6	3	16,6	4	22,2
Résidus polaires non chargés							
Ser (S)	16	3	18,8	4	25,0	5	31,3
Thr (T)	9	1	11,1	2	22,2	4	44,4
Asn (N)	5	3	60,0	3	60,0	2	40,0
Gln (Q)	20	7	35,0	8	40,0	10	50,0
Résidus chargés positivement							
Arg (R)	4	1	25,0	1	25,0	2	50,0
His (H)	5	0	0,0	2	40,0	2	40,0
Lys (K)	11	5	45,5	6	54,5	7	63,6
Résidus chargés négativement							
Asp (D)	4	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Glu (E)	19	0	0,0	1	5,3	2	10,5
Autres résidus							
Cys (C)	0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Gly (G)	5	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Pro (P)	35	0	0,0	0	0,0	2	5,7

Tableau 25. Spécificité de coupure de l'activité protéolytique contenue dans le surnageant de milieu de culture de *Streptococcus thermophilus* 4F44 (milieu YL + nickel + urée, 16 h à 42°C) vis-à-vis du résidu P1 de la liaison peptidique clivée de la caséine β (0,1%) à pH 6 après 1 h, 4 h et 22 h à 37°C.

L'hydrolyse en position P1 d'une liaison peptidique a été avérée quand le peptide présentant le résidu P1 en position carboxy terminale est retrouvé et/ou l'autre peptide généré présentant à son extrémité aminotermine le résidu en position P'1.

Résidus	Nombre de résidus dans la protéine	Hydrolyse de la caséine β (0,1%) à pH 6					
		Temps d'hydrolyse 1 h		Temps d'hydrolyse 4 h		Temps d'hydrolyse 22 h	
		Nombre d'hydrolyses après résidu	% par rapport au nombre de résidus de ce type	Nombre d'hydrolyses après ce résidu	% par rapport au nombre de résidus de ce type	Nombre d'hydrolyses après ce résidu	% par rapport au nombre de résidus de ce type
Résidus hydrophobes							
Ala (A)	5	1	20,0	2	40,0	2	40,0
Ile (I)	10	1	10,0	1	10,0	0	0,0
Leu (L)	22	6	27,3	9	40,9	13	59,1
Met (M)	6	0	0,0	3	50,0	3	50,0
Phe (F)	9	2	22,2	2	22,2	3	33,3
Tyr (Y)	4	2	50,0	1	25,0	2	50,0
Trp (W)	1	0	0,0	0	0,0	1	100,0
Val (V)	18	4	22,2	5	27,7	4	22,2
Résidus polaires non chargés							
Ser (S)	16	2	12,5	4	25,0	4	25,0
Thr (T)	9	1	11,1	2	22,2	4	44,4
Asn (N)	5	3	60,0	3	60,0	2	40,0
Gln (Q)	20	8	40,0	8	40,0	12	60,0
Résidus chargés positivement							
Arg (R)	4	1	25,0	1	25,0	2	50,0
His (H)	5	1	20,0	1	20,0	2	40,0
Lys (K)	11	5	45,5	5	45,5	6	54,5
Résidus chargés négativement							
Asp (D)	4	1	25,0	0	0,0	0	0,0
Glu (E)	19	0	0,0	2	10,5	3	15,8
Autres résidus							
Cys (C)	0	0	0,0	0	0,0	0	0
Gly (G)	5	0	0,0	0	0,0	0	0
Pro (P)	35	0	0,0	0	0,0	1	2,8

Tableau 26. Spécificité de coupure de l'activité protéolytique contenue dans le surnageant de milieu de culture de *Streptococcus thermophilus* 4F44 (milieu YL + nickel + urée, 16 h à 42°C) vis-à-vis du résidu P1 de la liaison peptidique clivée de la caséine α_{s1} (0,1%) à pH 7 après 1 h, 4 h et 22 h à 37°C. L'hydrolyse en position P1 d'une liaison peptidique a été avérée quand le peptide présentant le résidu P1 en position carboxy terminale est retrouvé et/ou l'autre peptide généré présentant à son extrémité aminotermine le résidu en position P'1.

Résidus	Hydrolyse de la caséine α_{s1} (0,1%) à pH 7						
	Nombre de résidus dans la protéine	Temps d'hydrolyse 1 h		Temps d'hydrolyse 4 h		Temps d'hydrolyse 22 h	
		Nombre d'hydrolyses après résidu	% par rapport au nombre de résidus de ce type	Nombre d'hydrolyses après ce résidu	% par rapport au nombre de résidus de ce type	Nombre d'hydrolyses après ce résidu	% par rapport au nombre de résidus de ce type
Résidus hydrophobes							
Ala (A)	9	0	0,0	0	0,0	1	11,1
Ile (I)	11	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Leu (L)	17	3	17,6	4	23,5	8	47,1
Met (M)	5	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Phe (F)	8	2	25,0	1	12,5	5	62,5
Tyr (Y)	10	1	10,0	1	10,0	3	30,0
Trp (W)	1	0	0,0	0	0	0	0
Val (V)	11	0	0,0	0	0	3	27,3
Résidus polaires non chargés							
Ser (S)	16	0	0,0	1	6,3	3	18,8
Thr (T)	5	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Asn (N)	8	2	25,0	1	12,5	4	50,0
Gln (Q)	14	2	14,3	4	28,6	5	35,7
Résidus chargés positivement							
Arg (R)	6	1	16,7	1	16,7	2	33,3
His (H)	5	0	0,0	2	40,0	2	40,0
Lys (K)	14	2	14,3	3	21,4	3	21,4
Résidus chargés négativement							
Asp (D)	7	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Glu (E)	25	2	8,0	2	8,0	3	12,0
Autres résidus							
Cys (C)	0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Gly (G)	9	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Pro (P)	17	0	0,0	0	0,0	0	0,0

Tableau 27. Spécificité de coupure de l'activité protéolytique contenue dans le surnageant de milieu de culture de *Streptococcus thermophilus* 4F44 (milieu YL + nickel + urée, 16 h à 42°C) vis-à-vis du résidu P1 de la liaison peptidique clivée de la caséine α_{s1} (0,1%) à pH 6 après 1 h, 4 h et 22 h à 37°C. L'hydrolyse en position P1 d'une liaison peptidique a été avérée quand le peptide présentant le résidu P1 en position carboxy terminale est retrouvé et/ou l'autre peptide généré présentant à son extrémité aminoterminal le résidu en position P'1.

Résidus	Nombre de résidus dans la protéine	Hydrolyse de la caséine α_{s1} (0,1%) à pH 6					
		Temps d'hydrolyse 1 h		Temps d'hydrolyse 4 h		Temps d'hydrolyse 22 h	
		Nombre d'hydrolyses après résidu	% par rapport au nombre de résidus de ce type	Nombre d'hydrolyses après ce résidu	% par rapport au nombre de résidus de ce type	Nombre d'hydrolyses après ce résidu	% par rapport au nombre de résidus de ce type
Résidus hydrophobes							
Ala (A)	9	1	11,1	0	0,0	2	22,2
Ile (I)	11	0	0,0	0	0,0	1	9,1
Leu (L)	17	5	29,4	6	35,3	7	41,2
Met (M)	5	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Phe (F)	8	3	37,5	3	37,5	3	37,5
Tyr (Y)	10	3	30,0	1	10,0	2	20,0
Trp (W)	1	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Val (V)	11	0	0,0	1	9,1	4	36,4
Résidus polaires non chargés							
Ser (S)	16	0	0,0	0	0,0	2	12,5
Thr (T)	5	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Asn (N)	8	2	25,0	2	25,0	3	37,5
Gln (Q)	14	2	14,3	2	14,3	5	35,7
Résidus chargés positivement							
Arg (R)	6	2	33,3	2	33,3	2	33,3
His (H)	5	0	0,0	2	40,0	2	40,0
Lys (K)	14	4	28,6	3	21,4	5	35,7
Résidus chargés négativement							
Asp (D)	7	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Glu (E)	25	3	12,0	3	12,0	4	16,0
Autres résidus							
Cys (C)	0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Gly (G)	9	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Pro (P)	17	0	0,0	0	0,0	0	0,0

Tableau 28. Spécificité de coupure de l'activité protéolytique contenue dans le surnageant de milieu de culture de *Streptococcus thermophilus* 4F44 (milieu YL + nickel + urée, 16 h à 42°C) vis-à-vis du résidu P1 de la liaison peptidique clivée de la caséine α_{S2} (0,1%) à pH 7 après 1 h, 4 h et 22 h à 37°C. L'hydrolyse en position P1 d'une liaison peptidique a été avérée quand le peptide présentant le résidu P1 en position carboxy terminale est retrouvé et/ou l'autre peptide généré présentant à son extrémité aminotermine le résidu en position P'1.

Résidus	Nombre de résidus dans la protéine	Hydrolyse de la caséine α_{S2} (0,1%) à pH 7					
		Temps d'hydrolyse 1 h		Temps d'hydrolyse 4 h		Temps d'hydrolyse 22 h	
		Nombre d'hydrolyses après résidu	% par rapport au nombre de résidus de ce type	Nombre d'hydrolyses après ce résidu	% par rapport au nombre de résidus de ce type	Nombre d'hydrolyses après ce résidu	% par rapport au nombre de résidus de ce type
Résidus hydrophobes							
Ala (A)	8	1	12,5	2	25,0	2	25,0
Ile (I)	11	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Leu (L)	12	3	25,0	5	41,7	2	16,7
Met (M)	4	1	25,0	1	25,0	1	25,0
Phe (F)	6	1	16,7	1	16,7	1	16,7
Tyr (Y)	12	2	16,7	2	16,7	3	25,0
Trp (W)	2	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Val (V)	14	2	14,3	2	14,3	1	7,1
Résidus polaires non chargés							
Ser (S)	17	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Thr (T)	15	2	13,3	3	20,0	5	33,3
Asn (N)	14	2	14,3	3	21,4	3	21,4
Gln (Q)	16	2	12,5	2	12,5	0	0,0
Résidus chargés positivement							
Arg (R)	6	2	33,3	3	50,0	3	50,0
His (H)	3	1	33,3	1	33,3	0	0,0
Lys (K)	24	6	25,0	10	41,7	10	41,7
Résidus chargés négativement							
Asp (D)	4	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Glu (E)	24	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Autres résidus							
Cys (C)	2	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Gly (G)	2	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Pro (P)	10	0	0,0	0	0,0	0	0,0

Tableau 29. Spécificité de coupure de l'activité protéolytique contenue dans le surnageant de milieu de culture de *Streptococcus thermophilus* 4F44 (milieu YL + nickel + urée, 16 h à 42°C) vis-à-vis du résidu P1 de la liaison peptidique clivée de la caséine α_{S2} (0,1%) à pH 6 après 1 h, 4 h et 22 h à 37°C.

L'hydrolyse en position P1 d'une liaison peptidique a été avérée quand le peptide présentant le résidu P1 en position carboxy terminale est retrouvé et/ou l'autre peptide généré présentant à son extrémité aminoterminal le résidu en position P'1.

Résidus	Hydrolyse de la caséine α_{S2} (0,1%) à pH 6						
	Nombre de résidus dans la protéine	Temps d'hydrolyse 1 h		Temps d'hydrolyse 4 h		Temps d'hydrolyse 22 h	
		Nombre d'hydrolyses après résidu	% par rapport au nombre de résidu de ce type	Nombre d'hydrolyses après ce résidu	% par rapport au nombre de résidus de ce type	Nombre d'hydrolyses après ce résidu	% par rapport au nombre de résidus de ce type
Résidus hydrophobes							
Ala (A)	8	1	12,5	2	25,0	2	25,0
Ile (I)	11	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Leu (L)	12	2	16,7	4	33,3	4	33,3
Met (M)	4	0	0,0	1	25,0	1	25,0
Phe (F)	6	1	16,7	1	16,7	2	33,3
Tyr (Y)	12	1	8,3	2	16,7	3	25,0
Trp (W)	2	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Val (V)	14	1	7,1	1	7,1	2	14,3
Résidus polaires non chargés							
Ser (S)	17	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Thr (T)	15	2	13,3	2	13,3	4	26,7
Asn (N)	14	0	0,0	2	14,3	3	21,4
Gln (Q)	16	2	12,5	2	12,5	1	6,3
Résidus chargés positivement							
Arg (R)	6	1	16,7	2	33,3	3	50,0
His (H)	3	0	0,0	1	33,3	0	0,0
Lys (K)	24	5	20,8	8	33,3	13	54,2
Résidus chargés négativement							
Asp (D)	4	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Glu (E)	24	0	0,0	0	0,0	1	4,2
Autres résidus							
Cys (C)	2	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Gly (G)	2	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Pro (P)	10	0	0,0	0	0,0	0	0,0

Tableau 30. Spécificité de coupure de l'activité protéolytique contenue dans le surnageant de milieu de culture de *Streptococcus thermophilus* 4F44 (milieu YL + nickel + urée, 16 h à 42°C) vis-à-vis du résidu P1 de la liaison peptidique clivée de la caséine κ (0,1%) à pH 7 après 1 h, 4 h et 22 h à 37°C.

L'hydrolyse en position P1 d'une liaison peptidique a été avérée quand le peptide présentant le résidu P1 en position carboxy terminale est retrouvé et/ou l'autre peptide généré présentant à son extrémité aminoterminale le résidu en position P'1.

Résidus	Nombre de résidus dans la protéine	Hydrolyse de la caséine κ (0,1%) à pH 7					
		Temps d'hydrolyse 1 h		Temps d'hydrolyse 4 h		Temps d'hydrolyse 22 h	
		Nombre d'hydrolyses après résidu	% par rapport au nombre de résidus de ce type	Nombre d'hydrolyses après ce résidu	% par rapport au nombre de résidus de ce type	Nombre d'hydrolyses après ce résidu	% par rapport au nombre de résidus de ce type
Résidus hydrophobes							
Ala (A)	15	1	6,7	2	13,4	2	13,4
Ile (I)	13	1	7,7	0	0	0	0
Leu (L)	8	1	12,5	2	25,0	1	12,5
Met (M)	2	0	0	0	0	1	50,0
Phe (F)	4	0	0	0	0	0	0
Tyr (Y)	9	0	0	1	11,1	3	33,3
Trp (W)	1	0	0	0	0	0	0
Val (V)	10	0	0	0	0	0	0
Résidus polaires non chargés							
Ser (S)	13	1	7,7	1	7,7	2	15,4
Thr (T)	14	0	0	0	0	0	0
Asn (N)	7	0	0	0	0	1	14,3
Gln (Q)	15	0	0	0	0	1	6,7
Résidus chargés positivement							
Arg (R)	5	0	0	0	0	0	0
His (H)	3	0	0	0	0	0	0
Lys (K)	9	0	0	0	0	0	0
Résidus chargés négativement							
Asp (D)	4	0	0	0	0	0	0
Glu (E)	12	0	0	0	0	0	0
Autres résidus							
Cys (C)	2	0	0	0	0	0	0
Gly (G)	2	0	0	0	0	0	0
Pro (P)	20	1	5	0	0	0	0

Tableau 31. Spécificité de coupure de l'activité protéolytique contenue dans le surnageant de milieu de culture de *Streptococcus thermophilus* 4F44 (milieu YL + nickel + urée, 16 h à 42°C) vis-à-vis du résidu P1 de la liaison peptidique clivée de la caséine κ (0,1%) à pH 6 après 1 h, 4 h et 22 h à 37°C.

L'hydrolyse en position P1 d'une liaison peptidique a été avérée quand le peptide présentant le résidu P1 en position carboxy terminale est retrouvé et/ou l'autre peptide généré présentant à son extrémité aminotermine le résidu en position P'1.

Résidus	Nombre de résidus dans la protéine	Hydrolyse de la caséine κ (0,1%) à pH 6					
		Temps d'hydrolyse 1 h		Temps d'hydrolyse 4 h		Temps d'hydrolyse 22 h	
		Nombre d'hydrolyses après résidu	% par rapport au nombre de résidus de ce type	Nombre d'hydrolyses après ce résidu	% par rapport au nombre de résidus de ce type	Nombre d'hydrolyses après ce résidu	% par rapport au nombre de résidus de ce type
Résidus hydrophobes							
Ala (A)	15	1	6,7	2	13,3	2	13,3
Ile (I)	13	1	7,7	0	0	0	0
Leu (L)	8	1	12,5	2	25,0	2	25,0
Met (M)	2	0	0	0	0	0	0
Phe (F)	4	0	0	0	0	0	0
Tyr (Y)	9	1	11,1	2	22,2	2	22,2
Trp (W)	1	0	0	0	0	0	0
Val (V)	10	0	0	0	0	0	0
Résidus polaires non chargés							
Ser (S)	13	1	7,7	2	15,4	1	7,7
Thr (T)	14	0	0	0	0	0	0
Asn (N)	7	0	0	1	14,3	0	0
Gln (Q)	15	0	0	0	0	0	0
Résidus chargés positivement							
Arg (R)	5	0	0	0	0	0	0
His (H)	3	0	0	0	0	0	0
Lys (K)	9	0	0	0	0	0	0
Résidus chargés négativement							
Asp (D)	4	0	0	0	0	0	0
Glu (E)	12	0	0	0	0	0	0
Autres résidus							
Cys (C)	2	0	0	0	0	0	0
Gly (G)	2	0	0	0	0	0	0
Pro (P)	20	1	5	0	0	0	0

Tableau 32. Synthèse de l'étude de la spécificité de l'enzyme PrtS soluble de *Streptococcus thermophilus* 4F44 par le cumul des nombres de liaisons clivées

dans chaque caséine et déduction pour la caséine entière, pour toutes les conditions expérimentales utilisées.

Résidus	Nombre de résidus caséine β	Nombre d'hydrolyses après résidu	Nombre de résidus caséine α_{s1}	Nombre d'hydrolyses après résidu	Nombre de résidus caséine α_{s2}	Nombre d'hydrolyses après résidu	Nombre de résidus caséine κ	Nombre d'hydrolyses après résidu	Nombre de résidus caséine entière	Nombre d'hydrolyses après résidu
Résidus hydrophobes										
Ala (A)	5	3 (60%)	9	1 (11,1%)	8	2 (25%)	15	4 (26,7%)	37	10 (27,0%)
Ile (I)	10	1 (10%)	11	1 (9,1%)	11	0 (0%)	13	1 (7,7%)	45	3 (6,7%)
Leu (L)	22	16 (72,7%)	17	9 (52,9%)	12	5 (41,7%)	8	4 (50%)	59	34 (57,6%)
Met (M)	6	3 (50%)	5	0 (0%)	4	1 (25%)	2	1 (50%)	17	5 (29,4)
Phe (F)	9	6 (66,6)	8	5 (62,5%)	6	2 (33,3%)	4	0 (0%)	27	13 (48,1%)
Tyr (Y)	4	2 (50%)	10	5 (50%)	12	4 (33,3%)	9	3 (33,3%)	35	14 (40%)
Trp (W)	1	1 (100%)	1	0 (0%)	2	0 (0%)	1	0 (0%)	5	1 (20,0%)
Val (V)	18	7 (38,8%)	11	4 (36,4%)	14	2 (14,3%)	10	0 (0%)	53	13 (24,5%)
Résidus polaires non chargés										
Ser (S)	16	6 (37,5%)	16	4 (25%)	17	0 (0%)	13	3 (23,1%)	62	13 (21%)
Thr (T)	9	4 (44,4%)	5	0 (0%)	15	6 (40%)	14	0 (0%)	43	10 (23,3%)
Asn (N)	5	3 (60%)	8	2 (25%)	14	4 (28,6%)	7	2 (28,6%)	34	11 (32,4%)
Gln (Q)	20	13 (65%)	14	5 (35,7%)	16	2 (12,5%)	15	1 (6,7%)	65	21 (32,3%)
Résidus chargés positivement										
Arg (R)	4	3 (75%)	6	2 (33,3%)	6	3 (50%)	5	0 (0%)	21	8 (38,1%)
His (H)	5	2 (40%)	5	2 (40%)	3	1 (33,3%)	3	0 (0%)	16	5 (31,2%)
Lys (K)	11	7 (63,6%)	14	6 (42,9%)	24	13 (54,2%)	9	0 (0%)	58	26 (44,8%)
Résidus chargés négativement										
Asp (D)	4	1 (25%)	7	0 (0%)	4	0 (0%)	4	0 (0%)	19	1 (5,3%)
Glu (E)	19	4 (21,1%)	25	5 (20%)	24	1 (4,2%)	12	0 (0%)	80	10 (12,5%)
Autres résidus										
Cys (C)	0	0	0	0	2	0 (0%)	2	0 (0%)	4	0 (0%)
Gly (G)	5	0 (0%)	9	0 (0%)	2	0 (0%)	2	0 (0%)	18	0 (0%)
Pro (P)	35	3 (8,6%)	17	0 (0%)	10	0 (0%)	20	1 (5%)	82	4 (4,9%)

2.4.2.3. Caséine α_{s2}

Concernant la caséine α_{s2} , après 1 h d'hydrolyse, le nombre de liaisons clivées à pH 7 est supérieur à celui obtenu à pH 6. Ainsi à pH 7, les résidus préférentiels sont Met, Arg, His et Lys. Après 4 h d'hydrolyse, les résidus Ala et Leu s'ajoutent et après 22 h les résidus Tyr, Thr et Phe (à pH 6 seulement) (Tableaux 28 et 29).

Pour la caséine α_{s2} , quand l'ensemble des conditions est rassemblé, les résidus préférentiels en position P1 qui présentent plus de 50% de liaison clivées sont Arg et Lys, et ceux qui présentent plus de 35% sont Leu, Phe, Tyr, Thr et His (Tableau 32).

2.4.2.4. Caséine κ

Le nombre de liaisons clivées dans la caséine κ est très restreint, seuls les résidus Leu et Tyr semblent préférentiels (Tableaux 30 et 31). Ainsi lorsque toutes les conditions sont rassemblées, les résidus préférentiels en position P1 qui présentent plus de 50% de liaison clivées sont Leu et Met et celui qui présente plus de 35% est Tyr (Tableau 32).

2.4.2.5. Synthèse

Afin de finaliser la spécificité de coupure de la protéase PrtS, l'ensemble des résidus en position P1 des liaisons clivées obtenues pour chaque caséine, pour toutes les conditions d'hydrolyses confondues et pour toutes les caséines confondues ont été rassemblés dans le tableau 32. Globalement, les résidus préférentiels sont Ala, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Val, Asn, Gln, Arg, His, Lys, Ser et Thr.

2.5. Peptides à activité biologique libérés à partir de caséines par PrtS de *S. thermophilus*

Les hydrolysats de la caséine entière, obtenus après action de la protéase PrtS contenue dans le milieu contiennent de nombreux peptides. Dans ce travail, les séquences des peptides générés ont été comparées aux séquences décrites dans la littérature des peptides à activité biologique issus de caséines. Ces activités biologiques peuvent concerner le système cardiovasculaire (antioxydants, antithrombotiques, inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I - ECA), le système nerveux (anxiolytiques, opiacés, anti-opiacés), le système digestif (chélateurs de minéraux, opiacés, anti-opiacés, antimicrobiens, immunomodulants), le système immunitaire (immunomodulants, cytomodulants, antibactériens, opiacés, anti-opiacés) ou le système osseux et dentaire (chélateurs de minéraux) (Hartmann et Meisel, 2007 ; Korhonen, 2009).

2.5.1. Peptides à activité biologique issus de l'hydrolyse de la caséine β par PrtS

De nombreux peptides à activité biologique issus de l'hydrolyse de la caséine β ont été décrits dans la littérature. Ils sont majoritairement issus de la partie amino-terminale (jusqu'au résidu 80) et carboxy-terminale (à partir du résidu 160) de la protéine. Étant donné que la partie carboxy-terminale de la caséine β est particulièrement sensible à l'hydrolyse par le surnageant contenant PrtS, la plupart des peptides à activité biologique identifiés au cours de cette étude proviennent de cette région.

Il s'agit de 19 peptides inhibiteurs de l'ECA, CN β -(f47-52), CN β -(f73-82), CN β -(f74-82), CN β -(f106-119), CN β -(f108-113), CN β -(f133-139), CN β -(f133-140), CN β -(f166-175), CN β -(f168-175), CN β -(f169-175), CN β -(f176-182), CN β -(f177-182), CN β -(f183-190), CN β -(f191-198), CN β -(f191-209), CN β -(f193-209), CN β -(f194-209), CN β -(f199-208), CN β -(f199-209) ; d'un peptide mitogène {CN β -(f192-209)} ; d'un peptide opiacé {CN β -(f59-68)} ; de deux peptides immunomodulants {CN β -(f191-209), CN β -(f193-209)} ; d'un peptide anti-bactérien {CN β -(f193-209)} ; d'un peptide antioxydant {CN β -(f98-105)} ; et de trois peptides antimutagènes {CN β -(f124-131), CN β -(f177-182), CN β -(f183-188)} (Tableau 33). Parmi les 19 peptides bioactifs inhibiteurs de l'ECA identifiés dans les hydrolysats de caséine par PrtS, 18 d'entre eux ont été également mis en évidence dans des produits laitiers (commerciaux ou non) fermentés par diverses bactéries lactiques (Tableau 33).

2.5.2. Peptides à activité biologique issus de l'hydrolyse de la caséine α_{s1} par PrtS

Au cours de notre étude, seuls six peptides bioactifs générés à partir de l'hydrolyse de la caséine α_{s1} ont été mis en évidence au sein des hydrolysats obtenus. Il s'agit des peptides CN α_{s1} -(f1-8), CN α_{s1} -(f1-9), CN α_{s1} -(f1-13) et CN α_{s1} -(f24-30) CN α_{s1} -(f24-32) et CN α_{s1} -(f25-32). Ils sont tous recensés comme des peptides inhibiteurs de l'ECA. Ces peptides ont été retrouvés soit dans des produits laitiers fermentés de type fromage comme le Festivo (Ryhänen *et al.*, 2001), le Gouda (Saito *et al.*, 2000) ou le Cheddar (Ong *et al.*, 2007) soit dans des hydrolysats enzymatiques (pepsine) de caséine (del Mar Contreras *et al.*, 2009) (Tableau 33).

Les peptides CN α_{s1} -(f1-8), CN α_{s1} -(f1-9) et CN α_{s1} -(f1-13) ont été isolés et identifiés après croissance en lait de *S. thermophilus* CNRZ385 ou de *S. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* Lb 397 (ou Lb1038) (Courtin et Rul, 2004).

Tableau 33. Peptides à activité biologique, issus de l'hydrolyse de la caséine entière (à 0,1 ou 0,01%), résultant de l'action pendant 1, 4 ou 22 h à pH 7 ou 6 à 37°C de la protéase PrtS soluble présente dans le surnageant de culture de *Streptococcus thermophilus* 4F44 (après 16 h de culture à 42°C dans le milieu YL + nickel + urée).

Les peptides ont été identifiés par spectrométrie de masse ESI –Q-TOF.

Fragments	Séquences	Produits (Références)
Peptides inhibiteurs de l'ECA		
β 47-52	(Q)DKIHPF(A)	Manchego, Roncal, Idiazabal, Cabrales, fromages de chèvre (Gomez-Ruiz <i>et al.</i> , 2004 ; Gomez-Ruiz <i>et al.</i> , 2006)
β 73-82	(Q)NIPPLTQTPV(V)	Lait fermenté <i>Lb. delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i> SS1 (Gobbetti <i>et al.</i> , 2000)
β 74-82	(N)IPPLTQTPV(V)	Lait fermenté <i>Lb. delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i> SS1 (Gobbetti <i>et al.</i> , 2000)
β 106-119	(K)HKEMPFKYPVEPF(T)	Hydrolysat de caséine <i>Lb. helveticus</i> CP790 (Yamamoto <i>et al.</i> , 1994)
β 108-113	(K)EMPFK(Y)	Lait fermenté Ropy (Pihlanto-Leppala <i>et al.</i> , 1998)
β 133-139	(N)LHLPL(L)	Lait fermenté <i>Enterococcus faecalis</i> (Miguel <i>et al.</i> , 2006)
β 134-140	(L)HLPL(L)(Q)	Hydrolysat de caséine par pepsin (del Mar Contreras <i>et al.</i> , 2009)
β 166-175	(L)SQSKVLPVPQ(K)	Caséine fermentée <i>Lb. animalis</i> DPC6134 (Hayes <i>et al.</i> , 2007a)
β 168-175	(Q)SKVLPVPQ(K)	Hydrolysat de caséine <i>Lb. helveticus</i> CP790 (Hernandez-Ledesma <i>et al.</i> , 2004a)
β 169-175	(S)KVLVPQ(K)	Hydrolysat de caséine <i>Lb. helveticus</i> CP790 (Maeno <i>et al.</i> , 1996)
β 176-182	(Q)KAVPYPQ(R)	Hydrolysat de caséine <i>Lb. helveticus</i> CP790 (Yamamoto <i>et al.</i> , 1994)
β 177-182	(K)AVPYPQ(R)	Hydrolysat de caséine <i>L. helveticus</i> CP790 (Yamamoto <i>et al.</i> , 1994)
β 183-190	(Q)RDMPIQAF(L)	Hydrolysat de caséine <i>Lb. helveticus</i> CP790 (Yamamoto <i>et al.</i> , 1994)
β 191-198	(F)LLYQEPVL(G)	"cheese like system of caprine and ovine milk" (Silva <i>et al.</i> , 2006)
β 191-209	(F)LLYQEPVLPVVRGPFPIIV(-)	Hydrolysat de caséine <i>Lb. helveticus</i> CP790 (Yamamoto <i>et al.</i> , 1994)
β 193-209	(L)YQEPVLPVVRGPFPIIV(-)	Cheddar (Ong <i>et al.</i> , 2007 ; Ong et Shah, 2008 ; Pihlanto-Leppala <i>et al.</i> , 1998)
β 194-209	(Y)QEPVLPVVRGPFPIIV(-)	Hydrolysat de caséine <i>Lc. lactis cremoris</i> (Gobbetti <i>et al.</i> , 2002)
β 199-208	(L)GPVVRGPFPII(V)	Lait fermenté <i>L. rhamnosus</i> (Hayes <i>et al.</i> , 2007b ; Hernandez-Ledesma <i>et al.</i> , 2004b ; 2005)
β 199-209	(L)GPVVRGPFPIIV(-)	Lait fermenté <i>Lc. lactis</i> et <i>Lb. helveticus</i> (Otte <i>et al.</i> , 2011)
α _{s1} 1-8	(-)RPKHPIKH(Q)	"cheese like system of caprine milk" (Silva <i>et al.</i> , 2006)
α _{s1} 1-9	(-)RPKHPIKH(Q)(G)	Festivo, Gouda, Cheddar (Saito <i>et al.</i> , 2000 ; Ryhänen <i>et al.</i> , 2001 ; Ong <i>et al.</i> , 2007)
α _{s1} 1-13	(-)RPKHPIKHQGLPQ(E)	Gouda (Saito <i>et al.</i> , 2000)
α _{s1} 24-30	(F)FVAPFPE(V)	Manchego (Gomez-Ruiz <i>et al.</i> , 2004)
α _{s1} 24-32	(F)FVAPFPEVF(G)	Cheddar (Ong et Shah, 2008)
α _{s1} 25-32	(F)VAPFPEVF(G)	Hydrolysat de caséine par la pepsine (del Mar Contreras <i>et al.</i> , 2009)
α _{s2} 174-181	(K)FALPQYLK(T)	Hydrolysat trypsique de caséine (Tauzin <i>et al.</i> , 2002)
α _{s2} 189-197	(K)AMKPWIQPK(T)	Hydrolysat de caséine <i>L. helveticus</i> CP790 (Maeno <i>et al.</i> , 1996)
α _{s2} 190-197	(A)MKPWIQPK(T)	Hydrolysat de caséine <i>L. helveticus</i> CP790 (Maeno <i>et al.</i> , 1996)
Peptides antioxydants		
β 98-105	(K)VKEAMAPK(H)	Cheddar <i>Lb. casei</i> ssp. <i>casei</i> 300 (Gupta <i>et al.</i> , 2010)
α _{s2} 174-181	(K)FALPQYLK(T)	Hydrolysat trypsiques de caséine (Lopez-Exposito <i>et al.</i> , 2007)
Peptides antimutagènes		
β 124-131	(Q)SLTLTDVE(N)	Lait fermenté <i>Lb. helveticus</i> L89 (Matar <i>et al.</i> , 1997)
β 177-182	(K)AVPYPQ(R)	Lait fermenté <i>Lb. helveticus</i> L89 (Matar <i>et al.</i> , 1997)
β 183-188	(Q)RDMPIQ(A)	Lait fermenté <i>Lb. helveticus</i> L89 (Matar <i>et al.</i> , 1997)
Peptides immunomodulants		
β 191-209	(F)LLYQEPVLPVVRGPFPIIV(-)	Cheddar (Minkiewicz <i>et al.</i> , 2000)
β 193-209	(L)YQEPVLPVVRGPFPIIV(-)	Hydrolysat de CN β (Sandre <i>et al.</i> , 2001)
Peptide opioïde		
β 59-68	(L)VYPFPGPIPN(S)	Hydrolyse pancréatique (Jinsmaa et Yoshikawa, 1999)
Peptide mitogène		
β 192-209	(L)LYQEPVLPVVRGPFPIIV(-)	Hydrolysat de CN β chymosine (Coste <i>et al.</i> , 1992)
Peptide antibactérien		
β 193-209	(L)YQEPVLPVVRGPFPIIV(-)	Hydrolysat de CN β (Sandre <i>et al.</i> , 2001)

2.5.3. Peptides à activité biologique issus de l'hydrolyse de la caséine α_{s2} par PrtS

Les peptides bioactifs issus de l'hydrolyse de la $CN\alpha_{s2}$ par PrtS identifiés dans cette étude sont trois peptides inhibiteurs de l'ECA { $CN\alpha_{s2}$ -(f189-197), $CN\alpha_{s2}$ -(f190-197) et $CN\alpha_{s2}$ -(f174-181)}, ce dernier est également un peptide antioxydant. Ces 3 peptides ont été mis en évidence lors d'une hydrolyse trypsique ou dans un hydrolysate caséinique par *L. helveticus* (Tauzin *et al.*, 2002 ; Maeno *et al.*, 1996) (Tableau 33).

La production de peptides bioactifs par PrtS à partir des caséines est dépendante des conditions d'hydrolyse (Tableaux 34, 35 et 36). Quelques peptides bioactifs formés par PrtS ont été générés à tous les temps d'hydrolyse à pH 6 ou 7 { $CN\beta$ -(f106-119), $CN\beta$ -(f108-113), $CN\beta$ -(f166-175), $CN\beta$ -(f168-175), $CN\beta$ -(f169-175), $CN\beta$ -(f176-182), $CN\beta$ -(f177-182), $CN\beta$ -(f183-190), $CN\beta$ -(f192-209), $CN\beta$ -(f193-209), $CN\alpha_{s1}$ -(f1-13) et $CN\alpha_{s2}$ -(f189-197)}. Ces peptides à activité biologique présents après 1 h et 22 h d'hydrolyse persistant dans le milieu, ils sont donc résistants à l'hydrolyse de PrtS. D'autres sont spécifiques de temps courts d'hydrolyse { $CN\beta$ -(f74-82), $CN\beta$ -(f133-139), $CN\beta$ -(f183-188), $CN\beta$ -(f191-209), $CN\beta$ -(f199-208) et $CN\alpha_{s2}$ -(f190-197)} et d'autres de temps longs, ainsi, le peptide antioxydant $CN\beta$ -(f98-105) et les peptides inhibiteurs d'ECA $CN\beta$ -(f47-52) et $CN\alpha_{s1}$ -(f24-30) n'ont été formés qu'après 22 h d'hydrolyse à pH 7 et/ou 6 (Tableau 34).

Tableau 34. Peptides à activité biologique issus de l'hydrolyse de la caséine β contenus dans 0,1 ou 0,01% de caséine entière, résultant de l'action pendant 1, 4 ou 22 h à pH 7 ou 6 à 37°C de la protéase PrtS soluble présente dans le surnageant de culture de *Streptococcus thermophilus* 4F44 (après 16 h de culture à 42°C dans le milieu YL + nickel + urée).

Les peptides ont été identifiés par spectrométrie de masse ESI –Q-TOF.

(P _i) séquence (P' _i)	Fragments	Caséine entière (m/v)								Activités biologiques
		0,1%				0,01%				
		Temps d'hydrolyse								
		1 h		4 h		22 h		1 h		
pH d'hydrolyse										
		7	6	7	6	7	6	7	7	
(Q)DKIHFP(A)	47-52					X				Inhibiteur ECA
(L)VYPFGPIP(S)	59-68			X		X	X		X	Opioïde
(Q)NIPPLTQTPV(V)	73-82		X			X	X	X	X	Inhibiteur ECA
(N)IPPLTQTPV(V)	74-82	X	X	X	X			X	X	Inhibiteur ECA
(K)VKEAMAPK(H)	98-105					X				Antioxydant
(K)HKEMPFKYPVEPF(T)	106-119	X	X	X	X	X	X	X	X	Inhibiteur ECA
(K)EMPFK(Y)	108-113	X	X	X	X	X	X	X	X	Inhibiteur ECA
(Q)SLTLTDVE(N)	124-131			X	X	X	X			Antimutagène
(N)LHLPLPL(L)	133-139				X					Inhibiteur ECA
(L)HLPLPL(Q)	134-140			X		X	X		X	Inhibiteur ECA
(L)SQSKVLPVPQ(K)	166-175	X	X	X	X	X	X	X	X	Inhibiteur ECA
(Q)SKVLPVPQ(K)	168-175	X	X	X	X	X	X	X		Inhibiteur ECA
(S)KVLVPQ(K)	169-175	X		X	X	X	X	X	X	Inhibiteur ECA
(Q)KAVPYPQ(R)	176-182	X	X	X	X	X	X	X	X	Inhibiteur ECA
(K)AVPYPQ(R)	177-182	X		X		X	X	X	X	Inhibiteur ECA / antimutagène
(Q)RDMPIQ(A)	183-188			X						Antimutagène
(Q)RDMPIQAF(L)	183-190	X		X	X		X	X		Inhibiteur ECA
(F)LLYQEPVL(G)	191-198	X			X	X		X		Inhibiteur ECA
(F)LLYQEPVLGPVRGPFPIIV(-)	191-209	X	X	X	X			X		Inhibiteur ECA / immunomodulant
(L)LYQEPVLGPVRGPFPIIV(-)	192-209	X	X	X	X		X	X		Mitogène
(L)YQEPVLGPVRGPFPIIV(-)	193-209		X		X	X	X	X	X	Immunomodulant / antibactérien
(Y)QEPVLGPVRGPFPIIV(-)	194-209	X	X	X			X	X		Inhibiteur ECA
(L)GPVRGPFPII(V)	199-208	X	X	X	X					Inhibiteur ECA
(L)GPVRGPFPIIV(-)	199-209				X			X	X	Inhibiteur ECA

Tableau 35. Peptides à activité biologique issus de l'hydrolyse de la caséine α_{s1} contenus dans 0,1 ou 0,01% de caséine entière, résultant de l'action pendant 1, 4 ou 22 h à pH 7 ou 6 à 37°C de la protéase PrtS soluble présente dans le surnageant de culture de *Streptococcus thermophilus* 4F44 (après 16 h de culture à 42°C dans le milieu YL + nickel + urée).

Les peptides ont été identifiés par spectrométrie de masse ESI –Q-TOF.

(P ₁) séquence (P' ₁)	Fragments	Caséine entière (m/v)								Activité biologique
		0,1%				0,01%				
		Temps d'hydrolyse								
		1 h	4 h	22 h	1 h	22 h	1 h	22 h		
pH d'hydrolyse										
		7	6	7	6	7	6	7	7	
(-)RPKHPIKH(Q)	1-8			X		X	X		X	Inhibiteur ECA
(-)RPKHPIKHQ(G)	1-9			X		X	X		X	Inhibiteur ECA
(-)RPKHPIKHQGLPQ(E)	1-13	X	X	X	X	X	X	X	X	Inhibiteur ECA
(F)FVAPFPE(V)	24-30					X	X			Inhibiteur ECA
(F)FVAPFPEVF(G)	24-32							X		Inhibiteur ECA
(F)VAPFPEVF(G)	25-32								X	Inhibiteur ECA

Tableau 36. Peptides identifiés à activité biologique issus de l'hydrolyse de la caséine α_{s2} contenus dans 0,1 ou 0,01% de caséine entière, résultant de l'action pendant 1, 4 ou 22 h à pH 7 ou 6 à 37°C de la protéase PrtS soluble présente dans le surnageant de culture de *Streptococcus thermophilus* 4F44 (après 16 h de culture dans le milieu YL + nickel + urée à 42°C).

Les peptides ont été identifiés par spectrométrie de masse ESI –Q-TOF.

(P ₁) séquence (P' ₁)	Fragments	Caséine entière (m/v)								Activités biologiques
		0,1%				0,01%				
		Temps d'hydrolyse								
		1 h	4 h	22 h	1 h	22 h	1 h	22 h		
pH d'hydrolyse										
		7	6	7	6	7	6	7	7	
(K)FALPQYLK(T)	174-181			X			X			Inhibiteur ECA / antioxydant
(K)AMKPWIQPK(T)	189-197	X	X	X	X	X	X	X		Inhibiteur ECA
(A)MKPWIQPK(T)	190-197		X	X	X					Inhibiteur ECA

Discussion

**Identification et caractérisation d'une forme
soluble d'une activité protéolytique pour
S. thermophilus 4F44**

1. Recherche d'une activité protéolytique extracellulaire chez différentes souches de *S. thermophilus*

Dans un précédent travail mené au laboratoire, l'activité protéolytique pariétale a été déterminée par zymographie chez 30 souches de *S. thermophilus*. Parmi les 30 souches testées, 12 ont montré une forte activité caséinolytique de surface (PrtS⁺), 3 une légère activité (PrtS^{+/-}) et 15 en étaient dépourvues (PrtS⁻) (Galia *et al.*, 2009).

Au cours de ce présent travail, le criblage par zymographie de ces trente souches a mis en évidence l'existence d'une activité protéolytique sous forme libre uniquement chez la souche 4F44. Le surnageant de centrifugation du milieu de culture de cette souche a été filtré (0,45 µm) afin d'éviter la présence de cellules et l'activité est toujours retrouvée dans ce surnageant filtré indiquant que la protéase est effectivement libérée dans le milieu.

Les mesures d'activité protéasique et peptidasique du surnageant du milieu de culture filtré ont été menées à l'aide de deux substrats nitroanilidés spécifiques : Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*NA et Lys-*p*NA. Au moins une protéase excrétée a été mise en évidence dans ce milieu de culture. Cette activité protéasique a très peu de chance de résulter d'une lyse cellulaire (protéase(s) intracellulaire(s)) sachant qu'aucune activité peptidasique n'a été détectée dans ce milieu.

Différentes hypothèses expliquant une activité protéolytique libre pourraient être énoncées :

La première hypothèse est qu'il pourrait s'agir d'une enzyme extracellulaire naturellement libre autre que la protéase PrtS. En effet, plusieurs souches de streptocoques pathogènes telles que *S. intermedius*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. oralis*, *S. salivarius*, *S. sanguis* et *S. sobrinus* produisent des protéases extracellulaires, qui dégradent la caséine (Labib *et al.*, 1978 ; Straus, 1982., Rogers *et al.*, 1990), la gélatine (Straus *et al.*, 1977 ; Harrington et Russell, 1994 ; Rogers *et al.*, 1990), des protéines de l'hôte comme l'albumine (Lo et Hughes, 1996 ; Straus, 1982), l'immunoglobuline A et des composants du complément (Kapur *et al.*, 1993 ; Plaut *et al.*, 1974), les protéines salivaires (Choi *et al.*, 1979) et des analogues du collagène (Harrington et Russell, 1994). Parmi ces protéases extracellulaires, une protéase à 52 kDa chez *S. mutans* (Harrington et Russell, 1994), une protéase à 146 kDa chez *S. oralis* (Harrington et Russell, 1994) et une autre à 98 kDa chez *S. gordonii* (Juarez et Stinson, 1999) ont été purifiées et caractérisées. Par ailleurs Jobin et Grenier (2003) rapportent la présence de trois protéases dans le milieu et les ont caractérisées (Arg-peptidase à 55 kDa, caséinase à 36 kDa, dipeptidyl peptidase à 70 kDa) chez la souche *S. suis*.

En deuxième hypothèse, si la forme libre de la protéase était également PrtS, les deux types de protéase (libre et ancrée) pouvaient provenir de deux allèles *prtS* différents. En effet, la protéase PrtS est une protéase qui a un domaine d'ancrage spécifique et qui est la cible d'une endo-transpeptidase (sortase A). Il était donc impératif de recenser le nombre d'allèles du gène *prtS* qui se trouvait au sein du génome de la souche 4F44 et d'en vérifier la séquence.

La troisième hypothèse était que si l'enzyme était de type PrtS, elle pouvait être ancrée dans un premier temps à la paroi pour cette souche et ensuite s'en décrocher pendant la croissance ou la récupération du surnageant. En effet, différents auteurs (Espeche-Turbay *et al.*, 2009 ; Laan et Konings, 1989 ; Tsakalidou *et al.*, 1999 ; Kunji *et al.*, 1996) ont montré que chez certaines bactéries lactiques présentant une enzyme sous forme ancrée de la protéase, dans des conditions particulières, cette protéase subit une auto-protéolyse. Les protéases ainsi libérées ont une masse moléculaire apparente plus faible. Or dans la littérature, il est expliqué que pour extraire PrtS de *S. thermophilus*, plusieurs traitements ont été nécessaires. De nombreux protocoles ont été testés tels que des traitements enzymatiques, mécaniques ou chimiques seuls ou associés. Nous pouvons citer une action par effet chimique au moyen de différents tampons contenant ou pas du CaCl₂ (Monnet *et al.*, 1987 ; Germond *et al.*, 2003), une action par effet enzymatique avec du lysozyme associé ou non à la mutanolysine (Georgalaki *et al.*, 2002 ; Fernandez-Espla *et al.*, 2000), et une action par effets mécaniques tels que l'alumine, les billes de verre ou diverses presses (Shahbal *et al.*, 1993 ; Fernandez-Espla *et al.*, 2000 ; Derzelle *et al.*, 2005). L'absence d'auto-protéolyse chez *S. thermophilus* est expliquée par l'absence du domaine B dans la séquence de la protéase, domaine qui est la cible de l'activité protéolytique pour les autres protéases. De plus, chez *Lb. rhamnosus* aucun relargage de la protéase PrtR n'a été détectée, les auteurs émettent l'hypothèse que la libération de la protéine n'a pas pu avoir lieu à cause de l'absence du domaine d'insert dans le domaine catalytique PR (Pastar *et al.*, 2006). Ainsi, il faudrait deux conditions pour qu'une protéase de bactérie lactique ancrée soit libérée : présence du domaine B mais aussi du domaine d'insert dans le domaine catalytique PR. Dans les banques de données, trois allèles de PrtS sont accessibles provenant des souches LMD-9, CNRZ 385 et JIM8232. Il était donc intéressant de déterminer la séquence du gène de la souche 4F44 pour la comparer à celles connues.

Enfin, en dernière hypothèse, la sortase A responsable de l'ancrage des protéines de paroi pourrait être déficiente. En effet, chez *L. monocytogenes*, chez *Staphylococcus aureus* et chez de nombreux streptocoques (*S. suis*, *S. gordonii*, *S. pyogenes*, *S. pyogenes*, *S. mutans*, *S. pneumoniae*) pour étudier l'impact de SrtA sur l'ancrage de facteurs de virulence, de nombreuses protéines libérées ont été identifiées chez des mutants *srtA*⁻ (*S. suis* : Osaki *et al.*, 2002, *S. gordonii* : Nobbs *et al.*, 2007 ; Davies *et al.*, 2009 ; Bolken *et al.*, 2001, *Streptococcus pyogenes* : Barnett et Scott, 2002,

S. mutans : Igarashi *et al.*, 2003 ; Lee et Boran, 2003, *S. pneumoniae* : Kharat et Tomasz, 2003, *Staphylococcus aureus* : Ton-That *et al.*, 2004, *L. monocytogenes* : Bierne *et al.*, 2002 ; Garandeau *et al.*, 2002). Si cette enzyme est déficiente, la protéase ne pourrait être que partiellement ancrée.

2. Mise en évidence des formes non mature et mature de la protéase

PrtS libre dans le surnageant de culture de *S. thermophilus* 4F44

Après enrichissement, la caractérisation de cette protéase a pu être réalisée par dégradation d'Edman après transfert sur membrane de deux bandes protéiques d'intérêt (Figure 25). Deux séquences N-terminales de 10 résidus d'acides aminés, ont été obtenues. La première séquence NIDSNTIITV, correspond à la séquence N-terminale de protéase PrtS dans sa forme mature. Cette forme a déjà été mise en évidence par Fernandez Espla *et al.* (2000). L'autre séquence obtenue, DELTSLVETK, correspond à l'extrémité N-terminale de la protéase PrtS dans sa forme non mature.

Les protéines à ancrer sont composées d'une séquence signal (à l'extrémité N-terminale) adressant la protéine à l'extérieur et d'un domaine d'ancrage ("sorting signal", à l'extrémité C-terminale) constitué de 35 résidus d'acide aminé qui reste transitoirement lié (liaisons non covalentes) à la membrane de la bactérie. Chez des mutants de *Staphylococcus aureus* où une partie du gène codant pour la protéine A (protéine ancrée) a été tronquée au niveau du domaine d'ancrage, la protéine A n'est plus ancrée, et se retrouve libre dans le milieu extracellulaire. Par contre, si des mutations sont réalisées au niveau de la séquence correspondant au motif LPXTG du domaine d'ancrage, la liaison covalente entre la protéine mutante et le peptidoglycane ne se fait pas mais la protéine est retenue au niveau membranaire *via* les interactions entre la membrane et la queue chargée de la protéine (Schneewind *et al.*, 1992 ; Ton-That *et al.*, 2004). Enfin, la délétion du motif signal d'ancrage LPKKT chez *Lactobacillus bulgaricus* conduit à retrouver libre la protéase de paroi (Germond *et al.*, 2003).

Par rapport à la protéase PrtS de LMD-9 qui présente une forme ancrée uniquement, celle de 4F44 ne présente aucune anomalie au niveau de la séquence du domaine d'ancrage pouvant expliquer la libération de l'enzyme. Sachant qu'il n'existe qu'un seul allèle codant la protéase PrtS pour la souche 4F44 (Galia *et al.*, 2009), le domaine d'ancrage et plus spécialement le motif d'ancrage ne pouvait être muté. Si ce domaine LPXTG avait été muté, 100% de la protéase auraient dû être retrouvés sous la forme libre et non 40%. De plus, la forme ancrée reste bien liée à la paroi au cours du temps. La comparaison de la séquence protéique du domaine d'ancrage contenant le motif LPNTG indique que la protéase PrtS de la souche 4F44 devrait être ancrée. Sa libération résulte donc d'un autre facteur.

Dans notre travail, la protéase PrtS se retrouve donc sous diverses formes, libres (mature ou non mature) et ancrée. Nous pouvons émettre différentes hypothèses pour expliquer la libération de

l'enzyme PrtS dans le milieu de culture de la souche 4F44 de *S. thermophilus*. Nous avons précédemment déterminé que la protéase ancrée, n'est pas relarguée. Donc, soit la séquence spécifique de la protéase de 4F44 entraîne sa libération partielle lors de l'excrétion sans que l'ancrage puisse se faire, soit c'est l'acteur permettant l'ancrage de la protéase qui est partiellement défectueux, cet acteur étant la sortase SrtA.

Dans la collection de souches de *S. thermophilus* du laboratoire, l'allèle *prtS* de LMD-9 est le plus courant, tout comme la présence de la protéase PrtS ancrée. La principale différence entre l'allèle *prtS* de LMD-9 (n'ayant que la forme ancrée de la protéase PrtS) et l'allèle *prtS* de 4F44 est l'absence de la duplication imparfaite (de 96 pb) trouvée dans le prodomaine. La protéase non maturée pour la souche 4F44 possède un prodomaine constitué de 109 résidus d'acides aminés au lieu de 141 pour la souche LMD-9.

La protéase est synthétisée sous forme de pré-pro-enzyme, la "séquence signal" est éliminée lors de l'exportation par l'enzyme "signal peptidase", ensuite lors de l'exportation, la protéine (exportée sous-forme de pro-enzyme) va subir une étape de maturation aboutissant à la protéase mature. Le fait de retrouver la protéase sous la forme pro-enzyme montre que la maturation n'a pas eu lieu. De plus il est délicat de conclure sur l'intérêt de la duplication dans la maturation puisque Fernandez-Esplá *et al.* (2000), pour la protéase ancrée de la souche CNRZ385, avaient mis en évidence seulement la forme mature et le gène codant pour la protéase ne comporte pas la duplication imparfaite. Néanmoins, Delorme *et al.*, 2010 annoncent que la séquence de ce gène pour la souche CNRZ385 comporte des erreurs de séquençage et que chez l'espèce *S. thermophilus*, cette duplication imparfaite située dans le prodomaine est importante pour la maturation de la protéase.

Le mécanisme de la maturation de la protéase chez *S. thermophilus* n'est pas encore connu, chez d'autres bactéries lactiques et d'autres espèces de streptocoques, des foldases interviennent. Ainsi chez *S. pyogenes*, la mutation d'un seul résidu de proline dans le prodomaine de la protéase SpeB aboutit à une conformation tridimensionnelle modifiée de la protéase active (chez le mutant par rapport au type sauvage), par contre la séquence de la protéine mature est identique chez le mutant et le sauvage. Ce résidu de proline est la cible d'une peptidyl-prolyl cis-trans isomérase (PPIase) appelée également foldase. Cette enzyme catalyse l'isomérisation cis/trans d'une liaison peptidyl-proline qui se trouve dans le prodomaine et influence le repliement de la protéase active, donc le positionnement des résidus du site actif (Lyon et Caparon, 2003). L'absence de duplication dans le prodomaine chez *S. thermophilus* 4F44 pourrait expliquer les deux formes (mature et non mature) mais aussi expliquer le non ancrage. En effet, en absence de la duplication, le phénomène de maturation pourrait mal se dérouler. Ce défaut de maturation pourrait engendrer un mauvais repliement de PrtS ; et le motif LPNTG de l'extrémité C-terminale de PrtS pourrait ne pas être reconnu par SrtA. La séquence de la protéase PrtS de la souche 4F44 est très proche de celle de *S. suis* (97% d'identité) dont la duplication est également absente. Chez *S. suis*, la protéase est ancrée

par SrtA (Bonifait *et al.*, 2010a). Il est à souligner que SrtA présente le plus faible pourcentage d'identité (64%) avec celle de *S. thermophilus* (Figure 35). Il serait donc intéressant d'élucider le phénomène de maturation de la protéase chez *S. thermophilus*. Les protéases PrtS des souches 4F44 et CNRZ385 présentent 99% d'identité (Tableau 15), leur principale différence se trouve au niveau du domaine A de 17 résidus d'acides aminés (dû à deux décalages de phase de lecture retrouvés chez la souche CNRZ385) (Figure 29). L'ancrage de la protéase chez la souche CNRZ385 et *S. suis*, minimiserait le rôle de la duplication, sauf si l'(es) enzyme(s) qui permette(nt) la maturation, les peptidyl-prolyl cis-trans-isomérase(s) est (sont) souche et espèce spécifique.

3. Le rôle de la sortase dans la libération de la protéase

Chez *S. thermophilus*, d'après le génome et par homologie avec les autres streptocoques, seule une sortase A (protéase à cystéine) est retrouvée. En effet, toutes les bactéries à gram positif analysées à ce jour possèdent un seul gène *srtA* (Nobbs *et al.*, 2009) qui est le "gène de ménage" des sortases. La sortase A chez *S. thermophilus*, située au niveau de la membrane plasmique, ancre la majorité des protéines au peptidoglycane de la paroi qui ont au niveau du domaine d'ancrage le motif "LPXTG" (Fernandez-Espla *et al.*, 2000). La littérature ne rapporte pour *S. thermophilus* aucune précision concernant d'autres sortases B, C ou D. La recherche *in silico* d'autres sortases sur les 4 génomes entièrement séquencés de *S. thermophilus* ne nous a pas permis d'en mettre en évidence. Le motif LPXTG du domaine d'ancrage est la cible de l'activité endopeptidasique puis transpeptidasique de la sortase A située au niveau de la membrane bactérienne (Fischetti *et al.*, 1990 ; Lee *et al.*, 2002 ; Paterson et Mitchell, 2004 ; Mazmanian *et al.*, 2001). *S. thermophilus* est l'une des seules espèces de Streptocoque à ne pas être pathogène. Chez les autres espèces de streptocoques (*S. agalactiae*, *S. suis*, *S. pyogenes* et *S. pneumoniae*) des protéases homologues à PrtS (CspA, SspA, C5a peptidase) existent et font partie des facteurs de virulence (Shelver et Bryan, 2008 ; Bryan et Shelver, 2009 ; Bonifait *et al.*, 2010a ; Cunningham, 2000 ; Ji *et al.*, 1997 ; Hollingshead *et al.*, 1986). Lors de différentes études pour comprendre l'impact des protéases de surface sur la virulence, de nombreux auteurs ont soit interrompu le gène codant la protéase, soit interrompu le gène codant la sortase A permettant l'ancrage des facteurs de virulence (Wang *et al.*, 2009 ; Vanier *et al.*, 2008, Bonifait *et al.*, 2010 a et 2010 b et Hu *et al.*, 2010). Dans les deux cas la virulence a été diminuée.

Si la libération partielle de PrtS chez la souche 4F44, était due à un allèle *srtA* différent de celui de la souche LMD-9, la présence de substitution(s) ne pourrait expliquer qu'une déficience, puisque 60% de l'activité protéasique extracellulaire est retrouvée ancrée.

La séquence complète du gène *srtA* de la souche 4F44 a été déterminée. Dans les banques de données, deux autres allèles sont répertoriés, celui de la souche LMD-9 et de la souche ND03. Les deux souches CNRZ1066 et LMG18311 présentent toutes deux un allèle tronqué. La séquence

protéique SrtA de la souche ND03 est très proche de celle de 4F44 (2 résidus différents sur 253). La souche ND03 ne présente pas le gène *prtS*, cette souche n'a donc pas pu servir de témoin. La séquence de SrtA de la souche 4F44 présente 6 substitutions par rapport à celle de la souche LMD-9 (dont la protéase est ancrée) et pourrait donc être déficiente (Figure 34). En effet, chez *S. pyogenes* la structure de SrtA a été déterminée. A l'aide de cette étude, les auteurs ont pu déterminer les différents acteurs importants pour les activités endo/transpeptidasiques de l'enzyme. Le site actif et la triade catalytique sont conservés, mais ils mentionnent également des résidus très importants pour que le motif d'ancrage LPXTG de la protéine à ancrer soit bien positionné par rapport au site actif. Ce sont notamment les acides aminés M₁₂₅, V₁₈₅, V₁₉₁, V₁₉₃, I₁₉₄, V₂₀₆ and I₂₁₈ de SrtA (Race *et al.*, 2009).

Un alignement multiple de séquences protéiques de SrtA de 14 espèces de streptocoques et de 3 souches de *S. thermophilus* a permis de montrer que les résidus d'acides aminés importants pour l'activité SrtA, démontrée chez *S. pyogenes* (Race *et al.*, 2009), sont conservés chez les différentes espèces. Les résidus du site actif et de la triade catalytique sont présents chez toutes les espèces (Figure 35). Par contre pour SrtA des souches de *S. thermophilus* LMD-9 et 4F44 (toutes deux présentant une protéase de paroi) parmi les 8 résidus d'acides aminés importants pour positionner le motif LPXTG chez *S. pyogenes*, un résidu diffère chez la souche LMD-9 et deux résidus diffèrent chez la souche 4F44. Le résidu I₂₀₃ de SrtA chez *S. pyogenes* est le seul résidu importants à être à la fois substitué chez *S. thermophilus* LMD-9 et 4F44 en V₂₀₃ (Figure 35). Ce résidu ne peut donc pas être responsable de la libération de PrtS chez 4F44. La sortase est bien fonctionnelle chez la souche LMD-9 puisqu'elle possède PrtS uniquement ancrée. Par contre le résidu I₂₂₇ présent chez la souche LMD-9 et chez les autres espèces de streptocoques est remplacé par le résidu V₂₂₇ chez les souches 4F44 et ND03 (Figure 35). Cette seule différence entre un résidu d'isoleucine et un résidu de valine suffirait-elle à rendre la sortase déficiente ?

D'autres protéines susceptibles d'être ancrées par SrtA ont été recherchées dans le surnageant de culture, afin de déterminer si elles étaient également libérées dans le milieu extracellulaire de la souche 4F44.

4. Identification de protéines excrétées dans le surnageant de culture de

S. thermophilus

Chez différents streptocoques, des mutants *srtA*⁻ ont été produits, pour montrer l'impact de la virulence de différents facteurs de virulence ancrés à la paroi *via* la sortase A. En plus des études de virulence, d'adhérence, et/ou de colonisation, des analyses protéomiques des milieux de culture obtenus après croissance de souches *srtA*⁻ comparées aux souches *srtA*⁺ ont été menées pour déterminer quelles protéines sont libérées en absence de SrtA. Ainsi, si pour la souche 4F44, la

protéase est libérée suite à une déficience de SrtA, d'autres protéines susceptibles d'être ancrées à la paroi *via* SrtA pourraient également être libérées.

Ainsi lors de cette étude, les protéines retrouvées dans le milieu de culture après croissance, ont été caractérisées. La phosphoglycérate kinase et l'énolase qui sont des enzymes de la glycolyse sont décrites classiquement comme des protéines solubles ou cytoplasmiques. Toutefois, les travaux de Hughes *et al.* (2002) et Whiting *et al.* (2002) ont montré respectivement que la phosphoglycérate kinase (PGK) chez *S. agalactiae* et l'énolase chez *S. pneumoniae* sont des protéines majeures de surface. Les séquences de ces deux enzymes ne présentent ni séquence signal ni domaine d'ancrage. Ces deux protéines ont été observées dans le milieu extracellulaire également, chez d'autres streptocoques comme *S. gordonii* (Davies *et al.*, 2009).

Le facteur d'élongation Tu (EF-Tu) impliqué dans l'élongation de la traduction a été retrouvé dans le milieu extracellulaire tout comme chez *S. mutans* (Len *et al.*, 2004) et *S. gordonii* (Davies *et al.*, 2009).

La protéine de fixation au glycane "glucan binding protein B" (GbpB) connue comme étant une protéine générale de stress (*gsp*) (Chia *et al.*, 2001a ; Chia *et al.*, 2001b ; Mattos-Graner *et al.*, 2001), est la seule à présenter un peptide signal, donc elle est peut être exportée vers l'extérieur de la cellule. Contrairement à la GbpC, la GbpB ne possède pas le motif d'ancrage LPXTG à l'extrémité C-terminale (Navarre et Schneewind, 1994). Cette protéine a été également trouvée parmi les protéines sécrétées chez *S. mutans* et *S. gordonii* (Mattos-Graner *et al.*, 2001 ; Davies *et al.*, 2009).

Toutes les protéines caractérisées dans le surnageant de culture de 4F44 ont déjà été démontrées comme étant extracellulaires chez d'autres streptocoques. L'analyse *in silico*, a montré que d'autres protéines auraient pu être retrouvées. Soit la souche 4F44 ne possède pas les gènes codant pour les protéines susceptibles d'être ancrées à la paroi, soit elle les possède mais ces protéines ne sont pas exprimées, ou sont exprimées et sont bien ancrées ou n'ont pu être détectées. En effet, les protéines ont été récupérées dans des conditions expérimentales bien spécifiques, dans une fraction précipitée à pH 4,6. Les protéines basiques (ABC-type amino acid transport system, permease et periplasmic component, GI:116627112, DMT-Drug/metabolite transporter-family permease, GI:55823527 ou 116628314, Putative small multi-drug export protein, GI:116627034) n'ont donc pas pu être détectées dans nos conditions opératoires. Par contre, nous aurions pu trouver les protéines "2',3'-cyclic nucleotide 2'-phosphodiesterase/3'-nucleotidase bifunctional periplasmic precursor protein" (GI:116627097) et "MUCin-Binding Protein" GI:116627423) qui ont toutes deux un point isoélectrique acide.

Au cours de ces analyses, nous n'avons donc pas pu mettre en évidence la présence d'autres protéines contenant un motif d'ancrage LPXTG qui aurait pu confirmer la déficience de la sortase A chez la souche 4F44.

5. Caractérisation de l'extrémité C-terminale de la protéase PrtS libre.

D'après la séquence protéique déduite du gène *prtS* de la souche 4F44, l'extrémité C-terminale est identique à celle de la souche LMD-9, donc il n'y a pas de raison pour qu'elle ne soit pas ancrée à la paroi par la sortase. Afin d'exclure l'hypothèse selon laquelle PrtS aurait subi une autoprotéolyse, et de vérifier l'hypothèse que SrtA est déficiente, l'extrémité C-terminale de la forme libre de PrtS a été caractérisée. La mise en évidence de deux peptides ($_{1512}\text{QVTQLPNTGENDTK}_{1525}$ et $_{1512}\text{QVTQLPNTGENDTKYYLVPGVVIIGLGTLVSIRR}_{1545}$) situés à l'extrémité C-terminale montre que l'extrémité C-terminale est intacte. Nous avons donc pu exclure l'autoprotéolyse. En effet, les protéases de paroi relarguées par action auto-protéolytique chez d'autres bactéries, sont des protéines dont la région C-terminale a été clivée (Figure 8) (Laan et Konings, 1989). Malgré l'absence du domaine B, présent pour les protéases qui subissent l'autoprotéolyse, il était important de connaître l'extrémité C-terminale car la séquence de PrtS de la souche 4F44 est différente de celle de LMD-9, et ne nous pouvions pas exclure un autre mode d'auto-protéolyse. Ce résultat conforte le fait que la protéase ancrée n'est pas libérée au cours du temps.

Enfin ce résultat permet de renforcer l'hypothèse que SrtA est partiellement défectueuse et ce au niveau de l'activité endopeptidasique. SrtA n'a donc pas hydrolysé la liaison entre les résidus de thréonine et de glycine du motif LPNTG. Cette déficience peut être soit due à la séquence de SrtA, soit à la structure de PrtS.

6. Hydrolyse de la caséine entière par PrtS libre de *S. thermophilus*

4F44

S. thermophilus 4F44 présente une activité de type PrtS au niveau pariétal et libre. En utilisant directement (sans étape d'enrichissement pour éviter l'autoprotéolyse) le milieu de culture de *S. thermophilus* 4F44 contenant la protéase libre, il est possible de générer des peptides à partir de caséine entière. Ces peptides ne sont alors ni dégradés par des peptidases, ni assimilés par les bactéries (qui ont été éliminées par filtration). La caractérisation des peptides a permis de déterminer la spécificité de coupure de la protéase et de recenser parmi les peptides générés des peptides à activités biologiques.

6.1. Sensibilité des caséines à l'hydrolyse par PrtS

Pour toutes les caséines il n'y a pas de différence significative entre l'hydrolyse réalisée à pH 6 et celle réalisée à pH 7. Le nombre de liaisons peptidiques rompues augmente avec le temps d'hydrolyse. Chaque caséine présente une zone résistante à l'hydrolyse. La caséine β se révèle être

un substrat préférentiel pour la protéase PrtS. La partie N-terminale de cette caséine est hydrophile notamment grâce au cluster de phosphosérine et résiste à l'hydrolyse. D'ailleurs au niveau de ce cluster (région 15-24) aucune liaison n'est hydrolysée.

La caséine α_{s2} a été moins rapidement hydrolysée par PrtS que la caséine β . Les différentes régions de la caséine α_{s2} montrent une sensibilité différente vis-à-vis de la protéase PrtS. Cette différence est similaire à celle observée par Tauzin *et al.* (2002) lors d'une hydrolyse trypsique. Il est à remarquer que la région dégradée de la caséine β est une zone hydrophobe, la région dégradée pour la caséine α_{s2} est hydrophile.

Les différentes régions de la caséine α_{s1} présentent également une sensibilité différente vis-à-vis de PrtS. La région située entre les résidus 40 et 80 est la zone la moins protéolysée. D'après Kumosinski *et al.* (1991), la caséine α_{s1} présente une zone hydrophile allant des résidus 1 à 12, suivie d'une zone hydrophobe puis une zone hydrophile (zone démarrant dans la région 40-50) englobant le cluster de résidus de phosphosérine et finissant vers le résidu 100. La zone allant du résidu 100 au résidu de tryptophane carboxy-terminal est, quant à elle, nettement hydrophobe. Les monomères de caséine α_{s1} s'associent par interactions hydrophobes et électrostatiques. Cette association de monomères pourrait empêcher l'accessibilité de PrtS à certaines liaisons peptidiques. Dans le cas présent, les interactions pourraient avoir lieu *via* des interactions hydrophobes et des résidus chargés puisqu'à la fois des régions hydrophobes et fortement chargées sont résistantes à l'hydrolyse. Le phénomène de masquage de certaines liaisons par des interactions protéine-protéine doit être privilégié pour expliquer la forte variabilité du taux d'hydrolyse des différentes régions de la protéine. En effet, ce n'est pas une affinité particulière de PrtS vis-à-vis de certaines régions en fonction de leur hydrophobie ou hydrophilie qui doit être évoquée car les régions fortement protéolysées ou au contraire résistantes à l'hydrolyse sont indistinctement des régions hydrophobes ou des régions hydrophiles.

Des quatre caséines présentes dans l'hydrolysate étudié, la caséine κ est celle qui a été le moins hydrolysée par PrtS, et la région correspondant au glycomacropéptide (GMP) est résistante à l'hydrolyse. Il est à souligner que le peptide GMP, κ -CN (f106-169) est difficilement hydrolysé par la chymosine, la pepsine et les enzymes coagulantes fongiques par des organismes comme *Mucor miehei* et *Cryphonectria parasita*. En revanche, il est sensible à l'action de la trypsine et de la chymotrypsine (Shammet *et al.*, 1992). Les chaînes de glycanes semblent protéger la κ -CN au niveau du fragment f(106-169) de l'hydrolyse enzymatique en augmentant le caractère hydrophile ainsi que la charge négative (augmentation des répulsions électrostatiques) (Zahraa, 2010).

Ainsi, si la zone protéique est accessible, les peptides sont facilement libérés et la différence dans le rapport enzyme/substrat n'a que peu d'influence sur la nature des peptides libérés dans les temps expérimentaux choisis.

6.2. Spécificité de coupure de PrtS

La spécificité de coupure de PrtS sur la (les) caséine(s) n'est pas beaucoup rapportée dans la littérature contrairement à d'autres bactéries lactiques. Des analyses préliminaires ont indiqué que la caséine β est le substrat préférentiel de la protéase PrtS (Shahbal *et al.*, 1993, Fernandez-Espla *et al.*, 2000). Les autres protéases de paroi des bactéries lactiques telles que PrtP (*L. lactis*), PrtL (*Lactobacillus lactis*), PrtH (*Lactobacillus helveticus*) et PrtR (*Lactobacillus rhamnosus*) dégradent préférentiellement la caséine β (Visser *et al.*, 1986 ; Visser *et al.*, 1994 ; Hebert *et al.*, 2008 ; Tsakalidou *et al.*, 1999 ; Scolari *et al.*, 2006 ; Pastar *et al.*, 2003). Dans leur étude sur la protéase PrtS pariétale purifiée de *S. thermophilus* CNRZ385, Fernandez-Espla *et al.* (2000) ont rapporté qu'elle découpe le fragment 1-23 de la caséine α_{s1} au niveau des liaisons peptidiques : ${}_8\text{His-Gln}_9$, ${}_9\text{Gln-Gly}_{10}$, ${}_{13}\text{Gln-Glu}_{14}$, ${}_{16}\text{Leu-Asn}_{17}$, ${}_{17}\text{Asn-Glu}_{18}$ et ${}_{21}\text{Leu-Arg}_{22}$ comme les protéases PrtP I et PrtP III de *Lc. lactis* HP (Exterkate et Alting, 1999), *Lc. lactis* AM1 (Exterkate *et al.*, 1991) respectivement et la CEP de *Lactobacillus helveticus* L89 (Martin-Hernandez *et al.*, 1994). Les spécificités des enzymes pariétales sont variables d'une bactérie lactique à l'autre. L'activité de l'enzyme soluble de la souche 4F44 sur la caséine β ressemble à celle de la PrtP de la souche *L. lactis*. La protéase PrtP I de *L. lactis* génère à partir de la caséine β au moins 100 peptides (Juillard *et al.*, 1995) et 11 types de liaisons peptidiques sont clivés préférentiellement (${}_{68}\text{Asn-Ser}_{69}$, ${}_{141}\text{Gln-Ser}_{142}$, ${}_{163}\text{Leu-Ser}_{164}$, ${}_{165}\text{Leu-Ser}_{166}$, ${}_{166}\text{Ser-Gln}_{167}$, ${}_{168}\text{Ser-Lys}_{169}$, ${}_{175}\text{Gln-Lys}_{176}$, ${}_{182}\text{Gln-Arg}_{183}$, ${}_{188}\text{Gln-Ala}_{189}$, ${}_{191}\text{Leu-Leu}_{192}$ et ${}_{193}\text{Tyr-Gln}_{194}$). Au cours de nos travaux, toutes ces liaisons sont rompues après 1 heure d'hydrolyse dans toutes les conditions expérimentales testées (0,1% ou 0,01% de caséine entière, pH 6 ou 7).

De plus, la similitude entre les sites de coupures mis en évidence sur la caséine α_{s1} et le peptide $\text{CN}\alpha_{s1}\text{-(f1-23)}$ (Fernandez-Espla *et al.*, 2000) étayent le fait que la protéase PrtS serait bien la seule enzyme impliquée dans la libération des peptides mis en évidence au cours de ces travaux. Ces peptides ne semblent pas être modifiés après leur libération par des activités de type aminopeptidasique ou carboxypeptidasique. Cette observation faite sur la caséine α_{s1} peut alors être extrapolée aux autres caséines α_{s2} , β , et κ .

Existe-t-il des résidus impliqués dans la liaison peptidique qui favorisent l'action de l'enzyme ? Il est nécessaire d'analyser prioritairement la nature des résidus P_1 et P'_1 . L'analyse de la nature des autres résidus P et P' peut être faite dans un second temps mais se révèle souvent plus complexe. Lors de cette recherche de spécificité, chaque résidu a été considéré comme accessible, bien que certaines zones soient inaccessibles pour PrtS. En effet, il vient d'être préalablement dit que toutes les régions des caséines α_{s1} , α_{s2} , β , et κ ne sont pas protéolysées avec la même efficacité. Ce phénomène n'est pas lié à la présence de résidus correspondant ou non à la spécificité de l'enzyme mais directement à l'accessibilité de ces régions. Si des résidus correspondant potentiellement à la

spécificité de l'enzyme sont présents dans des zones non accessibles, la protéolyse ne se fera pas et ces résidus risquent de ne pas être considérés comme des sites spécifiques de la protéase, ceci est plus limité en utilisant la caséine entière présentant une répartition plus homogène des différents résidus.

La protéase PrtS étant vraisemblablement la seule protéase impliquée dans la genèse des peptides mis en évidence au cours de cette étude, elle possède une activité de type trypsique (spécificité vis-à-vis des résidus de lysine et d'arginine) et de type chymotrypsique (spécificité vis-à-vis des résidus de phénylalanine, de tyrosine et de leucine). La spécificité vis-à-vis des résidus de tryptophane, constatée avec la chymotrypsine, ne peut pas être déterminée étant donné le faible nombre de résidus de cet acide aminé présent dans les séquences des caséines (6 résidus pour l'ensemble des caséines). L'un de ces résidus de tryptophane est de plus le résidu C-terminal de la caséine α_{s1} . De surcroît, les résidus de proline situés en position P₂ de deux résidus de tryptophane de la caséine α_{s2} pourraient empêcher le clivage de ces deux liaisons dans la caséine.

À ces activités de type trypsique et chymotrypsique s'ajoute une spécificité vis-à-vis des résidus d'histidine, d'asparagine, de glutamine et par rapport aux résidus de sérine et de thréonine dans le cas de la seule caséine β . Ce sont des résidus d'acides aminés polaires non chargés. Il est alors assez troublant que la protéase PrtS ait à la fois une spécificité vis-à-vis de résidus polaires et de résidus hydrophobes encombrants. La protéase PrtS est considérée comme étant une protéase de type subtilisine dont la spécificité est très large, avec une préférence pour les résidus encombrants non chargés (Markland et Smith, 1971).

6.3. Recherche dans les hydrolysats de peptides à activité biologique

L'activité de type trypsique et chymotrypsique de PrtS a permis d'envisager la présence dans les hydrolysats de peptides à activité biologique. En effet, de nombreux peptides référencés dans la littérature et issus des protéines laitières possèdent en position carboxy-terminale des résidus basiques (arginine, lysine) ou aromatiques (phénylalanine, tryptophane, tyrosine).

Les peptides bioactifs caractérisés dans les hydrolysats obtenus dans ce travail correspondent à des peptides décrits dans la littérature. Certains autres peptides possèdent peut-être des activités biologiques mais seuls des tests enzymatiques et/ou biologiques pourraient le confirmer. En outre, certains peptides pourraient être des fragments précurseurs de peptides à activité biologique, la libération de ces derniers pourrait avoir lieu dans le tractus digestif du consommateur.

Pour la recherche de peptides à activité biologique, seuls les peptides dont la masse est supérieure à 400 et inférieure à 2000 m/z ont été pris en compte lors de l'analyse par spectrométrie de masse. Ainsi les peptides constitués de moins de 5 ou plus de 35 résidus sont écartés de l'analyse. Donc, de nombreux di et tripeptides ayant une activité biologique (essentiellement inhibiteur de

l'ECA) n'ont pu être détectés. Aucun peptide à activité technofonctionnelle n'a pu être mis en évidence. En effet, ceux-ci sont dans la majorité des cas de grande taille.

Dans un précédent travail mené au laboratoire, des peptides ont été générés à partir de caséines purifiées en plaçant dans un tampon des cellules viables de diverses souches de *S. thermophilus* (Miclo *et al.*, article soumis). Dans le tableau 37, les peptides à activité biologique au nombre de 33 obtenus avec la protéase PrtS libre de *S. thermophilus* 4F44 lors de ces travaux ont été comparés avec ceux obtenus avec les cellules bactériennes de *S. thermophilus* 4F44 présentant la protéase PrtS pariétale placées dans un tampon phosphate contenant des caséines (Miclo *et al.*, 2011 soumis). Vingt peptides à activité biologique sont retrouvés après hydrolyse avec la protéase libre ou pariétale. Treize peptides ne sont pas détectés avec la protéase pariétale, et 4 ne sont pas retrouvés avec la protéase libre. Par exemple, le fragment 1-23 de la caséine α_{s1} n'a pas été retrouvé dans nos conditions d'hydrolyse. Par contre, Miclo *et al.* (article soumis) démontrent que certaines souches de *S. thermophilus*, dont 4F44, placées dans un tampon contenant de la caséine α_{s1} génèrent ce peptide après 4 h d'incubation à 42°C. Ce peptide est décrit comme étant à la fois un peptide à activité antimicrobienne (Hill *et al.*, 1974 ; Lahov et Regelson, 1996) et immunomodulante, mais ayant aussi un pouvoir émulsifiant (Shimizu *et al.*, 1984). Trois peptides mis en évidence avec la protéase libre, n'ont pas été retrouvés dans les hydrolysats caséiniques obtenus avec la protéase pariétale de 4F44 (Miclo *et al.*, 2011 soumis) mais avec la souche LMD-9 pour le peptide α_{s1} -(f24-30), la souche ATE19PB8 pour le peptide α_{s1} -(f25-32) ou avec la souche PB385 pour le peptide α_{s2} -(f174-181).

Pour générer des peptides d'intérêt à partir de PrtS, il serait préférable d'utiliser la protéase PrtS libre, les peptides obtenus ne seraient ni internalisés par la bactérie, ni digérés par l'activité peptidasique pariétale. En effet, en cultivant des bactéries, certains peptides générés par le système protéolytique sont internalisés, donc disparaissent du milieu. De plus, une activité peptidasique pariétale a été détectée au cours de ces travaux, lors d'utilisation du substrat Lys-pNA. Cette activité a également été mise en évidence lors de la dégradation de peptides à activité biologique avec des souches de *S. thermophilus* ayant ou pas l'activité protéasique pariétale PrtS (Hafeez, communication personnelle).

Tableau 37. Peptides à activité biologique détectés dans l'hydrolysate de la caséine entière (0,1 ou 0,01%), pendant 1, 4 ou 22 h à pH 7 ou 6 à 37°C par la protéase PrtS soluble présente dans le surnageant de culture de *Streptococcus thermophilus* 4F44 (après 16 h de culture à 42°C dans le milieu YL + nickel + urée) et ceux détectés par Miclo *et al.* (accepté) lors de l'hydrolyse (4 h à pH 7,5) de caséines individuelles par les cellules bactériennes de la souche 4F44.

1- 1 h d'hydrolyse pH 7,5 avec 0,1 % de caséinate, 2- 1 h d'hydrolyse pH 5,5 avec 0,1 % de caséinate, 3- 4 h d'hydrolyse pH 7,5 avec 0,1 % de caséinate, 4- 4 h d'hydrolyse pH 5,5 avec 0,1 % de caséinate, 5- 22 h d'hydrolyse pH 7,5 avec 0,1 % de caséinate, 6- 22 h d'hydrolyse pH 5,5 avec 0,1 % de caséinate, 7- 1 h d'hydrolyse pH 7,5 avec 0,01 % de caséinate, 8- 22 h d'hydrolyse pH 7,5 avec 0,01 % de caséinate.

Les peptides ont été identifiés par spectrométrie de masse ESI-Q-TOF.

Fragments	Séquences	PrtS libre (présent travail)	PrtS pariétale (Miclo <i>et al.</i> , accepté)
Peptides inhibiteurs de l'ECA			
β 47-52	(Q)DKIHPF(A)	5	Non détecté
β 73-82	(Q)NIPPLTQTPV(V)	2, 5, 6, 7, 8	Non détecté
β 74-82	(N)IPPLTQTPV(V)	1, 2, 3, 4, 7, 8	Non détecté
β 106-119	(K)HKEMPFKYPVEPF(T)	Toutes les conditions	Détecté
β 108-113	(K)EMPFK(Y)	Toutes les conditions	Non détecté
β 133-139	(N)LHLPLPL(L)	4	Non détecté
β 134-140	(L)HLPLPL(Q)	3, 5, 6, 8	Non détecté
β 166-175	(L)SQSKVLVVPQ(K)	Toutes les conditions	Détecté
β 168-175	(Q)SKVLVVPQ(K)	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	Détecté
β 169-175	(S)KVLVVPQ(K)	1, 3, 4, 5, 6, 7, 8	Détecté
β 176-182	(Q)KAVYPQ(R)	Toutes les conditions	Détecté
β 177-182	(K)AVYPQ(R)	1, 3, 4, 5, 6, 7, 8	Détecté
β 183-190	(Q)RDMPIQAF(L)	1, 3, 4, 6, 7	Détecté
β 191-198	(F)LLYQEPVL(G)	1, 4, 5, 7	Détecté
β 191-209	(F)LLYQEPVLGPVRGPFPIIV(-)	1, 2, 3, 4, 7	Détecté
β 193-198	(L)YQEPVL(G)	Non détecté	Détecté
β 193-202	(L)YQEPVLGPVR(G)	Non détecté	Détecté
β 193-209	(L)YQEPVLGPVRGPFPIIV(-)	2, 4, 5, 6, 7, 8	Détecté
β 194-209	(Y)QEPVLGPVRGPFPIIV(-)	1, 2, 3, 6, 7	Détecté
β 199-208	(L)GPVRGPFPII(V)	1, 2, 3, 4	Non détecté
β 199-209	(L)GPVRGPFPIIV(-)	4, 7, 8	Détecté
α _{s1} 1-8	(-)RPKHPIKH(Q)	3, 5, 6, 8	Détecté
α _{s1} 1-9	(-)RPKHPIKH(Q)	3, 5, 6, 8	Détecté
α _{s1} 1-13	(-)RPKHPIKHQGLPQ(E)	Toutes les conditions	Détecté
α _{s1} 24-30	(F)FVAPFPE(V)	5, 6	Non détecté
α _{s1} 24-32	(F)FVAPFPEVF(G)	7	Détecté
α _{s1} 25-32	(F)VAPFPEVF(G)	8	Non détecté
α _{s2} 174-181	(K)FALPQYLK(T)	3, 6	Non détecté
α _{s2} 189-197	(K)AMKPWIQPK(T)	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	Détecté
α _{s2} 190-197	(A)MKPWIQPK(T)	2, 3, 4	Détecté
α _{s2} 198-202	(K)TKVIP(Y)	Non détecté	Détecté
Peptides antioxydants			
β 98-105	(K)VKEAMAPK(H)	5	Détecté
α _{s2} 174-181	(K)FALPQYLK(T)	3, 6	Non détecté
Peptides antimutagènes			
β 124-131	(Q)SLTLTDVE(N)	3, 4, 5, 6	Non détecté
β 177-182	(K)AVYPQ(R)	1, 3, 5, 6, 7, 8	Détecté
β 183-188	(Q)RDMPIQ(A)	3	Non détecté
Peptides immunomodulants			
β 191-209	(F)LLYQEPVLGPVRGPFPIIV(-)	1, 2, 3, 4, 7	Détecté
β 193-209	(L)YQEPVLGPVRGPFPIIV(-)	2, 4, 5, 6, 7, 8	Détecté
α _{s1} 1-23	(-)RPKHPIKHQGLPQEVLENENLLRF(F)	Non détecté	Détecté
Peptide opioïde			
β 59-68	(L)VYPFPGIPN(S)	3, 5, 6, 8	Non détecté
Peptide mitogène			
β 192-209	(L)LYQEPVLGPVRGPFPIIV(-)	1, 2, 3, 4, 7	Détecté
Peptides antibactériens			
β 193-209	(L)YQEPVLGPVRGPFPIIV(-)	2, 4, 5, 6, 7, 8	Détecté
α _{s1} 1-23	(-)RPKHPIKHQGLPQEVLENENLLRF(F)	Non détecté	Détecté

Conclusions et Perspectives

S. thermophilus est une bactérie anaérobie et aérotole'ante. Elle est la seule espèce GRAS (Generally Recognized As Safe) du genre *Streptococcus* ; elle est très importante dans l'industrie laitière car elle est massivement utilisée dans la fabrication des produits laitiers fermentés, des fromages et yaourts grâce à son rôle homofermentaire dans la fermentation du lait.

Du fait de son caractère auxotrophe pour quelques acides aminés, sa croissance et l'acidification du milieu en résultant dépendent de sa capacité à trouver des peptides ou des acides aminés libres dans le lait. En effet, la croissance de la plupart des souches de *S. thermophilus* est stimulée par addition de peptides (2 à 5 résidus) et de résidus d'acides aminés dans le milieu. Cependant cette source libre d'azote (peptides et acides aminés) n'est pas suffisante dans le lait. Pour cette raison, sa croissance dépend de son système protéolytique. Ce système demeure peu connu chez *S. thermophilus*. Il est composé d'une protéase de paroi, PrtS, dégradant la caséine en oligopeptides, d'un système de transport des peptides pour leur internalisation et de peptidases intracellulaires pour les hydrolyser en acides aminés. La protéase PrtS est une protéase à sérine de la famille des subtilisines, elle est généralement ancrée à la paroi grâce à une enzyme, la sortase.

Dans ce travail, nous avons recherché les activités protéasiques solubles dans le surnageant de culture de nos souches, afin de bien connaître le système protéolytique de notre collection, sachant que certaines souches de différents streptocoques telles que *S. mutans*, *S. gordonii*, *S. oralis* et *S. sanguinis* produisent des protéases extracellulaires (Harrington et Russell 1994 ; Juarez et Stinson, 1999 ; Lo et Hughes, 1996 ; Straus, 1982). Parmi les 30 souches de *S. thermophilus* du laboratoire, seule la souche 4F44 excrète au moins une protéase dans le milieu de culture. Cette protéase est une enzyme de type PrtS ; en zymographie l'activité apparaît sous la forme de deux bandes d'hydrolyse. Leurs masses moléculaires apparentes sur le zymogramme et en gel PAGE-SDS sont de l'ordre de 154 et 170 kDa respectivement.

La suite de ce travail a été consacrée à l'identification et la caractérisation de l'enzyme sous forme extracellulaire chez la souche 4F44 et la détermination de sa spécificité de coupure sur la caséine. L'utilisation des substrats synthétiques spécifiques (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA et Lys-pNA) a permis de démontrer que la protéase retrouvée libre ou soluble chez la souche 4F44 est réellement une enzyme extracellulaire. L'activité de la forme libre de type PrtS est détectée dès le début de croissance ; cependant, l'activité sur substrat synthétique diminue dès la fin de cette phase exponentielle due à l'acidification du milieu. L'activité maximale dans le milieu de culture est à pH 5,8

environ, elle correspond à 40% de l'activité totale. Le micro-séquençage d'Edman réalisé sur les bandes protéiques découpées après électrotransfert sur une membrane en PVDF a permis d'identifier les 2 bandes observées chez la souche 4F44 comme étant des formes de l'enzyme PrtS pariétale, ceci après comparaison des séquences obtenues aux banques de données sur la protéase PrtS de la souche LMD-9 (numéro d'accèsion : GI:116100941). Ces bandes correspondent à une forme de PrtS sans peptide signal (forme non mature de PrtS, 170 kDa) et à une forme mature de PrtS (154 kDa).

La présence d'une protéase extracellulaire sous forme libre dans le milieu de culture n'a jamais été rapportée pour *S. thermophilus*, d'où l'intérêt de chercher à comprendre pourquoi la protéase PrtS est libre dans le milieu chez la souche 4F44.

La séquence de la protéase PrtS avant toute maturation comprend 7 domaines (peptide signal / propeptide / catalytique / A / H / W et ancrage). Le domaine d'ancrage (35 acides aminés) se situant à l'extrémité C-terminale est important pour l'ancrage au peptidoglycane de la paroi de la bactérie. Chez la souche 4F44 comme pour les autres souches ou espèce (*S. thermophilus* LMD-9, CNRZ385 et JIM8232 et *S. suis* 89/1591) le domaine d'ancrage contient réellement (confirmation par spectrométrie de masse) le motif LPXTG normalement reconnu par la sortase. L'ancrage devrait avoir lieu sur la paroi. De plus, toutes ces souches présentent 97 à 98% d'homologie entre elles, et seule la souche 4F44 a PrtS libre dans son milieu de culture. La principale différence entre l'allèle *prtS* de LMD-9 et celui de 4F44 est la présence d'une duplication au niveau de la région codant pour le prodomaine. Cette région dupliquée serait impliquée dans la maturation. Pour la souche 4F44 l'absence de cette duplication pourrait engendrer deux formes de protéase libre, la forme non maturée et la forme maturée.

L'analyse de la séquence codante du gène *srtA* chez les souches de *S. thermophilus* (4F44 et LMD-9, PB302, CNRZ307, PB180) et chez *S. pyogenes* a été effectuée pour rechercher si la sortase elle-même ne serait pas responsable du non-ancrage de PrtS. Six résidus de la séquence protéique déduite du gène chez 4F44 sont différents des autres souches LMD-9, PB302, CNRZ307, PB180 de *S. thermophilus* tandis que le site catalytique (Arg₂₂₀, Cys₂₁₂, His₁₄₆) et les résidus essentiels pour son activité (TLVTC) sont bien conservés. Quelques disparités existent entre certaines souches parmi les résidus de la sortase importants dans la reconnaissance du motif LPXTG mais ne peuvent expliquer la situation particulière de la souche 4F44. Seul le résidu d'acide aminé Ile₂₂₂ (souche LMD-9) a été remplacé par un résidu valyl. Cette substitution pourrait être à l'origine d'une déficience partielle de la sortase chez la souche 4F44. L'analyse par spectromètre de masse MS/MS des peptides tryptiques de PrtS libre de la souche 4F44 montre l'intégrité de la région du domaine d'ancrage du côté C-terminal. Il n'y a pas eu d'activité endopeptidasique de la sortase.

L'analyse *in silico* des 4 génomes connus de *S. thermophilus* a montré que cinq protéines contenant le motif LPXTG peuvent être des substrats putatifs de SrtA. Aucune des protéines retrouvées dans le milieu de culture de 4F44 et que nous avons pu identifier (facteur d'élongation,

EF-Tu, émolase, phosphoglycérate kinase et "glucan binding protein") ne contient le motif LPXTG. Elle ne peuvent donc nous aider dans l'explication de la libération de PrtS dans le milieu.

L'étude de la spécificité de coupure de PrtS libre de la souche 4F44 sur la caséine entière a montré globalement que la caséine β est le substrat préférentiel. L'analyse en spectrométrie de masse MS/MS des peptides générés par l'hydrolyse des caséines a montré une large spécificité de coupure (Ala, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Val, Ser, Thr, Asn, Gln, Arg, His et Lys en position P₁). La taille des peptides générés identifiés (détectables en LC/MS) est de 5 à 35 résidus, ceux-ci pourront être internalisés par *S. thermophilus* pour être hydrolysés en acides aminés par ses peptidases intracellulaires afin de fournir une source d'azote disponible pour sa croissance. Par contre, si l'hydrolyse se fait dans un milieu ne contenant plus de bactérie, les peptides ne seront pas internalisés par la bactérie et resteront disponibles.

Dans nos travaux, la souche *S. thermophilus* 4F44, à la différence d'autres souches ayant la protéase PrtS pariétale, libère cette enzyme PrtS dans le milieu de culture. Il sera intéressant de poursuivre ce travail afin de déterminer la cause exacte du mauvais ancrage de la protéase PrtS chez la souche *Streptococcus thermophilus* 4F44.

Une approche par génie génétique pourrait aider à expliquer cette libération d'enzyme dans le milieu de culture. Cette libération peut résulter soit de la protéase elle-même, soit de la sortase A. Il serait donc intéressant de faire des échanges d'allèle *srtA* entre les souches LMD-9 et 4F44. Pour cela, il faut interrompre le gène *prtS* (ou *srtA*) chez la souche 4F44 et placer l'allèle *prtS* (ou *srtA*) de LMD-9 et inversement.

Si l'allèle *prtS* de LMD-9 placé dans la souche 4F44 aboutit à une protéase libre, la séquence protéique sera mise hors de cause dans la libération de la protéase ; à l'inverse elle sera impliquée si la protéase est 100% ancrée à la paroi. De plus si l'allèle *prtS* de 4F44 placé dans la souche LMD-9 aboutit à une protéase libre, la séquence protéique pourra être la cause de la libération, mais si elle est ancrée à la paroi cette séquence sera mise hors de cause. Si la séquence protéique est responsable, il sera intéressant de comprendre si c'est l'absence de la duplication (importante pour la maturation) qui est en cause. Il serait intéressant de construire un allèle *prtS* de 4F44 mutant, contenant la duplication dans la région codant pour le prodomaine de la protéase, et vérifier si la protéase est ancrée à 100%. Si la séquence de la protéase PrtS de 4F44 n'explique pas la libération de la protéase, il sera également nécessaire de faire un remplacement d'allèle *srtA* entre la souche LMD-9 et 4F44.

De plus, il faudrait élucider la maturation de la protéase PrtS chez *S. thermophilus* LMD-9 et 4F44. Des gènes de maturases ont été identifiés sur le génome de *S. thermophilus* LMD-9 mais le rôle de ces enzymes n'a pas été caractérisé. Tout d'abord, il faudrait déterminer la séquence de ces gènes chez la souche 4F44 pour savoir si la(es) maturase(s) est(sont) différente(s).

Les perspectives à long terme de ce travail de recherche sont nombreuses. En effet, nous savons que la sélection de ferments lactiques de qualité est une préoccupation constante des industriels laitiers. L'amélioration des connaissances concernant les bactéries lactiques, et plus particulièrement de leur système protéolytique, permettrait de sélectionner de nouvelles souches.

Il serait important de poursuivre le présent travail afin d'étudier la production de peptides à activité biologique par action de cette enzyme sur les protéines du lactosérum voire du lait.

La spécificité de PrtS soluble de la souche 4F44, principalement trypsique et chymotrypsique, est intéressante puisque de nombreux peptides à activité biologique décrits dans la littérature sont issus des hydrolyses trypsique ou chymotrypsique des caséines. Ces peptides bioactifs, concentrés, peuvent être intégrés dans des produits alimentaires à qualité nutraceutique, ou bien se trouver directement dans l'aliment, et avoir des applications pharmaceutiques pour le traitement de l'anxiété, des diarrhées, de l'hypertension, de l'immunodéficience, ou encore des défauts de fixation du calcium dentaire. Sur ce plan, l'utilisation dans la filière lait de la souche 4F44, par exemple présente un fort potentiel d'applications et peut avoir des retombées économiques importantes en apportant une forte valorisation à un produit alimentaire simple comme le yaourt.

Références Bibliographiques

- Alloing G., de Philip P., and Claverys J.P. (1994). Three highly homologous membrane-bound lipoproteins participate in oligopeptide transport by the Ami system of the Gram-positive *Streptococcus pneumoniae*. *J. Mol. Biol.* 241, 44-58.
- Anastasiou R., Papadelli M., Georgalaki M.D., Kalantzopoulos G., and Tsakalidou E. (2002). Cloning and sequencing of the gene encoding X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase (PepX) from *Streptococcus thermophilus* strain ACA-DC 4. *J. Appl. Microbio.* 93, 52-59.
- Atlan D., Laloï P., and Portalier R. (1989). Isolation and characterization of aminopeptidase-deficient *Lactobacillus bulgaricus* mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1717-1723.
- Banks D.J., Porcella S.F., Barbian K.D., Beres S.B., Philips L.E., Voyich J.M., DeLeo F.R., Martin J.M., Somerville G.A., and Musser J.M. (2004). Progress toward characterization of the group A *Streptococcus* metagenome: complete genome sequence of a macrolide-resistant serotype M6 strain. *J Infect Dis.* 190, 727-738.
- Barnett T.C., and Scott J. R. (2002). Differential recognition of surface proteins in *Streptococcus pyogenes* by two sortase gene homologs. *J. Bacteriol.* 184, 2181-2191.
- Bentley R.W., Leigh J.A. and Collins M.D. (1991). Intrageneric structure of *Streptococcus* based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences. *Int J Syst Bacteriol.* 41, 487-494.
- Beres S.B., Sesso R., Pinto S.W., Hoe N.P., Porcella S.F., Deleo F.R., and Musser J.M. (2008). Genome sequence of a Lancefield group C *Streptococcus zooepidemicus* strain causing epidemic nephritis: new information about an old disease. *PLoS One.* 3, e3026.
- Beres S.B., Sylva G.L., Barbian K.D., Lei B., Hoff J.S., Mammarella N.D., Liu M.Y., Smoot J.C., Porcella S.F., Parkins L.D., Campbell D.S., Smith T.M., McCormick J.K., Leung D.Y., Schlievert P.M., and Musser J.M. (2002). Genome sequence of a serotype M3 strain of group A *Streptococcus*: phage-encoded toxins, the high-virulence phenotype, and clone emergence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99,10078-10083.
- Bierne H., Mazmanian S. K., Trost M., Pucciarelli M. G., Liu G., Dehoux P., Jansch L., Garcia-del Portillo F., Schneewind O., and Cossart P. (2002). Inactivation of the *srtA* gene in *Listeria monocytogenes* inhibits anchoring of surface proteins and affects virulence. *Mol. Microbiol.* 43, 869-881.
- Binetti A.G., Quiberoni A., Reinheimer J.A. (2002). Phage adsorption to *Streptococcus thermophilus*. Influence of environmental factors and characterization of cell-receptors. *Food Research International.* 35, 73-83.
- Bolken T.C., Franke C.A., Jones K.F., Zeller G.O., Jones C.H., Dutton E.K., and Hruby D.E. (2001). Inactivation of the *srtA* gene in *Streptococcus gordonii* inhibits cell wall anchoring of surface proteins and decreases in vitro and in vivo adhesion. *Infect. Immun.* 69,75-80.
- Bolotin A., Quinquis B., Renault P., Sorokin A., Ehrlich S.D., Kulakauskas S., Lapidus A., Goltsman E., Mazur M., Pusch G.D., Fonstein M., Overbeek R., Kyprides N., Purnelle B., Prozzi D., Ngui K., Masuy D., Hancy F., Burtreau S., Boutry M., Delcour J., Goffeau A., and Hols P. (2004). Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nat Biotechnol.* 22, 1554-1558.

- Bonifait L., de la Cruz Dominguez-Punaro M., Vaillancourt K., Bart C., Slater J., Frenette M., Gottschalk M., and Daniel Grenier D. (2010a). The cell envelope subtilisin-like proteinase is a virulence determinant for *Streptococcus suis*. *BMC Microbiol.* 10, 42.
- Bonifait L., Vaillancourt K., Gottschalk M., Frenette M., and Grenier D. (2011). Purification and characterization of the subtilisin-like protease of *Streptococcus suis* that contributes to its virulence. *Vet Microbiol.* 148, 333-40.
- Braun L., Dramsi S., Dehoux P., Bierne H., Lindhal G. and Cossart P. (1997). InlB: an invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association. *Mol. Microbiol.* 25, 285-294.
- Bruinenberg P.G., Doesburg P., Alting A.C., Exterkate F.A., deVos W.M., and Siezen R.J. (1994). Evidence for a large dispensable segment in the subtilisin-like catalytic domain of the *Lactococcus lactis* cell-envelope proteinase. *Protein Eng.* 7, 991-996.
- Bryan J.D., and Shelver D.W. (2009). *Streptococcus agalactiae* CspA is a serine protease that inactivates chemokines. *J. Bacteriol.* 191,1847-1854.
- Carratalá J., Alcaide F., Fernández-Sevilla A., Corbella X., Liñares J., and Gudiol F. (1995). Bacteremia due to viridans streptococci that are highly resistant to penicillin: increase among neutropenic patients with cancer. *Clin Infect Dis.* 20, 1169–1173
- Chapot-Chartier M. P., Rul F., Nardi M., and Gripon J.C. (1994). Gene cloning and characterization of PepC, a cysteine aminopeptidase from *Streptococcus thermophilus*, with sequence similarity to the eucaryotic bleomycin hydrolase. *Eur J Biochem.* 224, 497-506.
- Charbonnel P, Lamarque M., Aubel D., Piard J., Juillard V., and Atlan D. (2004). Qui régit la spécificité de transport des oligopeptides chez *Lactococcus lactis* ? *Lait.* 84, 95-102.
- Chavagnat F., Casey M.G., and Meyer J. (1999). Purification, characterization, gene cloning, sequencing, and overexpression of aminopeptidase N from *Streptococcus thermophilus* A. *Appl Environ Microbiol.* 65, 3001–3007.
- Chavagnat F., Meyer J., and Casey M. (2000). Purification, characterisation, cloning and sequencing of the gene encoding oligopeptidase PepO from *Streptococcus thermophilus* A. *FEMS microbiology letters.* 191, 79-85.
- Chen C.C., and Cleary P.P. (1990). Complete nucleotide sequence of the streptococcal C5a peptidase gene of *Streptococcus pyogenes*. *J. Biol. Chem.* 263, 3161-3167.
- Chia J.S., Lee Y.Y., Huang P.T., and Chen J.Y. (2001a). Identification of stress-responsive genes in *Streptococcus mutans* by differential display reverse transcription PCR. *Infect Immun* 69, 2493-2501.
- Chia J.S., Chang L.Y., Shun C.T., Chang Y.Y., Chen J.Y. (2001b). A 60-kilodalton immunodominant glycoprotein is essential for cell wall integrity and the maintenance of cell shape in *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 69, :6987-6998.
- Choih S. J., Smith Q.T., and Schachtele C. F. (1979). Modification of human parotid saliva proteins by oral *Streptococcus sanguis*. *J. Dent. Res.* 58, 516-524.
- Cleary P.P. (2001). Streptococcal C5a peptidase vaccine. US Patent 6270775.

- Cleary P.P., and Stafslie D.K. (2002). Streptococcal C5a peptidase vaccine. US Patent 6355255.
- Cleary P.P., and Stafslie D.K. (2005). Streptococcal C5a peptidase vaccine. US Patent 6951653^
- Cleary P.P., and Stafslie D.K. (2007). Streptococcal C5a peptidase vaccine. US Patent 7256265
- Cleary P.P., and Stafslie D.K. (2009). Streptococcal C5a peptidase vaccine. US Patent 7635483
- Cole J.N., Henningham A., Gillen C.M., Ramachandran V., and Walker M.J. (2008). Human pathogenic streptococcal proteomics and vaccine development. *Proteomics Clin. Appl.* 2, 387-410.
- Comfort D., and Clubb R.T. (2004). A comparative genome analysis identifies distinct sorting pathways in Gram-positive bacteria. *Infect. Immun.* 72, 2710-2722.
- Coolbear T., Holland R., and Crow V.L. (1992). Parameters affecting the release of cell surface components and lysis of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Int. Dairy J.* 2, 213-232.
- Cossart P., and Jonquieres R. (2000). Sortase, a universal target for therapeutic agents against Gram-positive bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* 97, 5013-5015.
- Coste M., Rochet V., Léonil J., Mollé D., Bouhallab S., and Tomé D. (1992). Identification of C-terminal peptides of bovine beta-casein that enhance proliferation of rat lymphocytes. *Immunology Letters.* 33, 41-46.
- Courtin P., and Rul F. (2004). Interactions between microorganisms in a simple ecosystem: yogurt bacteria as a study model. *Lait.* 84, 25-134.
- Cunningham M. W. (2000). Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin Microbiol Rev.* 13, 470-511.
- Davies J.R., Svensäter G., and Herzberg M. C. (2009). Identification of novel LPXTG-linked surface proteins from *Streptococcus gordonii*. *Microbiology.* 155, 1977-1988.
- de Roissart H., and Luquet F.M. (1994) « Bactéries lactiques », I & II. Lorica (Chemin de Saint Georges, F-38410, France), pp. 1219.
- Del Mar Contreras M., Carron R., Montero M., and Recio I. (2009). Novel casein-derived peptide with anti-hypertensive activity. *Int. Dairy J.* 19, 566-573.
- Delorme C., Bartholini C., Bolotine A., Ehrlich S.D., and Renault P. (2010). Emergence of a cell wall protease in the *Streptococcus thermophilus* population. *Appl Environ Microbiol.* 76, 451-60.
- Delorme C. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. *Int. J. Food Microbiol.* 126, 274-277.
- Derzelle S., Bolotin, A., Mistou M.Y., and Rul F. (2005). Proteome analysis of *Streptococcus thermophilus* grown in milk reveals pyruvate formate-lyase as the major upregulated protein. *Appl Environ Microbiol.* 71, 8597-8605.
- Deutsch S.M., Mollé D., Gagnaire V., Plot M., Atlan, D., and Lortal S. (2000). Hydrolysis of sequenced β -casein peptides provides new insight into peptidase activity from thermophilic lactic acid bacteria and highlights intrinsic resistance of phosphopeptides. *Applied and Environmental Microbiology.* 66, 5360-5367.

- Dieye Y., Oxaran V., Ledue-Clier F., Alkhakaf W., Buist G., Juillard V., Lee C. W., and Piard J. C. (2010). Functionality of Sortase A in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol.* 76, 7332-7337.
- Doeven M.K., van den Bogaart G., Krasnikov V., and Poolman B. (2008). Probing receptor-translocator interactions in the oligopeptide ABC transporter by fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys J.* 94, 3956-3965.
- Douglas D., Frank A., and Mao D. (2005). Linear ion traps in mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 24, 1-29.
- Dramsi S., Trieu-Cuot P., and Bierne H. (2005). Sorting sortases: a nomenclature proposal for the various sortases of Gram-positive bacteria. *Res.Microbiol.* 156, 289-297.
- Edwards M.S., and Baker C.J. (2005). Group B streptococcal infections in elderly adults. *Clin. Infect. Dis.* 41, 839-847.
- Egan S.A., Kurian D., Ward P.N., Hunt L., and Leigh J.A. (2010). Identification of sortase A (SrtA) substrates in *Streptococcus uberis*: evidence for an additional hexapeptide (LPXXXD) sorting motif. *J. Proteome Res.* 9, 1088-95.
- Enright M., and Spratt B. (1999). Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol.* 7, 482-487.
- Espeche-Turbay M.B., Savoy de Giori G., and Hebert E.M. (2009). Release of the cell-envelope-associated proteinase of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *lactis* CRL 581 is dependent upon pH and temperature. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* 57, 8607-8611.
- Exterkate, F.A., and Alting A.C. (1999). Role of calcium in activity and stability of the *Lactococcus lactis* cell envelope proteinase. *Appl. Environ.Microbiol.* 65, 1390-1396.
- Exterkate F.A., Alting A.C., and Slangen C.J. (1991). Specificity of two genetically related cell-envelope proteinases of *Lactococcus lactis* subsp.*cremoris* towards α_{s1} -casein-(1-23)-fragment. *Biochem. J.* 273,135-139
- Ezzat N., Zevaco C., El Soda M., and Gripon G.C. (1987). Partial purification and characterization of a cell wall associated proteinase from *Lacoobacillus bulgaricus*. *Milchwissenschaft.* 42, 95-97.
- Facklam R. (2002). What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clinical Microbiology Reviews.* 15, 613-630.
- Farrow J.A., and Collins M.D. (1984). DNA base composition, DNA-DNA homology and long-chain fatty acid studies on *streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*. *J Gen Microbiol.* 130, 357-362.
- Fernandez-Espla M.D., and Rul F. (1999). PepS from *Streptococcus thermophilus* - A new member of the aminopeptidase T family of thermophilic bacteria. *Eur J Biochem.* 263, 502-510.
- Fernandez-Espla M.D., Garault P., Monnet V., and Rul F. (2000). *Streptococcus thermophilus* cell wall-anchored proteinase: release, purification, and biochemical and genetic characterization. *Appl Environ Microbiol.* 66, 4772-4778.

- Fira D., Kojic M., Banina A., Spasojevic I., Strahinic I., and Topisirovic L. (2001). Characterization of cell envelope-associated proteinases of thermophilic lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*. 90, 123-130.
- Fischer G., Decaris B., and Leblond P. (1997). Occurrence of deletions, associated with genetic instability in *Streptomyces ambofaciens*, is independent of the linearity of the chromosomal DNA. *J. Bacteriol.*, 179, 4553-4558.
- Fischetti V.A., Pancholi V., and Schneewind O. (1990). Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from Gram-positive cocci. *Mol. Microbio.* 4, 1603-1605.
- Foster T.J., and McDevitt D. (1994). Surface-associated proteins of *Staphylococcus aureus*: their possible roles in virulence. *FEMS Microbiol Lett.* 118, 199-205.
- Galia W., Perrin C., Genay M., and Dary A. (2009). Variability and molecular typing of *Streptococcus thermophilus* strains displaying different proteolytic and acidifying properties. *Int. Dairy J.* 19 (2), 89-95.
- Garandeau C., Reglier-Poupet H., Dubail I., Beretti J.L., Berche P., and Charbit A. (2002). The sortase SrtA of *Listeria monocytogenes* is involved in processing internalin and in virulence. *Infect. Immun.* 70, 1382-1390.
- Garault P., Letort C., Juillard V., and Monnet V. (2000). Branched-chain amino acid biosynthesis is essential for optimal growth of *Streptococcus thermophilus* in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5128-5133.
- Garault P., Le Bars D., Besset C., and Monnet V. (2002) Three oligopeptide-binding proteins are involved in the oligopeptide transport of *Streptococcus thermophilus*. *J Biol Chem.* 277, 32-39.
- Gardan R., Besset C., Guillot A., Gitton C., and Monnet V. (2009). The oligopeptide transport system is essential for the development of natural competence in *Streptococcus thermophilus* strain LMD-9. *J. Bacteriol.* 191, 4647-4655.
- Georgalaki M.D., Papdelli M., Anastasiou R., Kalantzopoulos G., and Tsakalidou E. (2002). Purification and characterization of the X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase (PepX) from *Streptococcus macedonicus* and cloning of the pepX gene. *Lait.* 82, 657-671.
- Germond J.E., Delley M., Gilbert C., and Atlan D. (2003). Determination of the domain of the *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* cell surface proteinase PrtB involved in attachment to the cell wall after heterologous expression of the *PrtB* gene in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol*, 69, 3377-3384.
- Ghuysen J.M., and Hakenbeck R. (ed.). (1994). Bacterial cell wall. Elsevier Science B.S., Amsterdam, The Netherlands.
- Gianfaldoni C, Maccari S, Pancotto L, Rossi G, Hilleringmann M, Pansegrau W, Sinisi A, Moschioni M, Masignani V, Rappuoli R, Del Giudice G, Ruggiero P. (2009). Sortase A confers protection against *Streptococcus pneumoniae* in mice. *Infect Immun.* 77, 2957-2961.
- Gilbert C., Atlan D., Blanc B., Portalier R., Germond G.J., Lapiere L., and Mollet B. (1996). A new cell surface proteinase: sequencing and analysis of the *prtB* gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *J. Bacteriol.* 178, 3059-3065.

- Gobbetti M.; Ferranti P.; Smacchi E.; Goffredi F.; and Addeo F. (2000). Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Appl. Environ. Microb.* 66, 3898-3904.
- Gobbetti M., Stepaniak L., De Angelis M., Corsetti A., and Di Cagno R. (2002). Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing. *Critical Reviews in Food Science Nutrition.* 42, 223–239.
- Gomez-Ruiz J.A., Ramos M., and Recio I., (2004). Identification and formation of angiotensin converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheese by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1054, 269–277.
- Gomez-Ruiz J.A., Taborda G., Amigo L., Recio I., and Ramos M. (2006). Identification of ACE inhibitory peptides in different Spanish cheeses by tandem mass spectrometry. *Eur. Food Res. Technol.* 223, 595–601.
- Gupta N., Hixson K. K., Culley D. E., Smith R. D., and Pevzner P. A. (2010). Analyzing protease specificity and detecting in vivo proteolytic events using tandem mass spectrometry. *Proteomics.* 10, 2833–2844.
- Guss B., Uhlen M., Nilsson B., Lindberg M., Sjoquist J., and Sjobahl J. (1984). Region X, the cell-wall-attachment part of staphylococcal protein A. *Eur.J.Biochem.* 138, 413-420.
- Harrington D.J., and Russell R.R. (1994). Identification and characterisation of two extracellular proteases of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol.Lett.* 121, 237-241.
- Harris T. O., Shelver D.W., Bohnsack J.F., and Rubens C.E. (2003). A novel streptococcal surface protease promotes virulence, resistance to opsonophagocytosis, and cleavage of human fibrinogen. *J. Clin. Investig.* 111, 61-70.
- Hartmann R., and Meisel H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr Opin Biotechnol.* 18, 163-169.
- Hayes M., Stanton C., Slattery H., O'Sullivan O., Hill C., Fitzgerald G.F., and Ross R.P. (2007a). Casein fermentate of *Lactobacillus animalis* DPC6134 contains a range of novel propeptide angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Appl Environ Microbiol.* 73, 4658-4667.
- Hayes M., Stanton C., Fitzgerald G.F., and Ross R.P. (2007b). Putting microbes to work: dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part II: bioactive peptide functions. *Biotechnol J.* 2, 435-449.
- Hebert E.M., Mamone G., Picariello G., and Raya R.R. (2008). Characterization of the Pattern of α_{s1} - and β -casein breakdown and release of a bioactive peptide by a cell envelope proteinase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581. *Appl Environ Microbiol.* 74, 3682-3689.
- Herbert B.R., Molloy M.P., Gooley A.A., Walsh B.J., Bryson W.G., and Williams K.L. (1998). Improved protein solubility in two-dimensional electrophoresis using tributyl phosphine as reducing agent. *Electrophoresis.* 19, 845-851.
- Hernandez-Ledesma B., Amigo L., Ramos M., and Recio I. (2004a). Application of high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry to the identification of biologically active peptides produced by milk fermentation and simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Chromatography A*, 1049, 107–114.

Hernandez-Ledesma B., Amigo L., Ramos M., and Recio I. (2004b). Angiotensin converting enzyme inhibitory activity in commercial fermented products. Formation of peptides under simulated gastrointestinal digestion. *J. Agric. Food Chem.* 52, 1504–1510.

Hernandez-Ledesma B., Miralles B., Amigo L., Ramos M., and Recio. I. (2005). Identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides in fermented milk *J Sci Food Agric* 85, 1041–1048.

Hill R. D., Lahov E., and Givol D. (1974). A rennin-sensitive bond in alpha and beta casein. *Journal of Dairy Research.* 41, 147–153.

Hiron A. (2007). Les transporteurs de peptides de *Staphylococcus aureus*. Thèse de l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, Agro Paris Tech.

Holck A., and Naes H. (1992). Cloning, sequencing and expression of the gene encoding the cell-envelope-associated proteinase from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NCDO 151. *J Gen Microbiol.* 138, 1353-1364.

Holden M.T.G., Hauser H., Sanders M., Ngo T.H., Cherevach I., Cronin A., Goodhead I., Mungall K., Quail M.A., Price C., Rabbinowitsch E., Sharp S., Croucher N.J., Chieu T.B., Mai N.T.H., Diep T.S., Chinh N.T., Kehoe M., Leigh J.A., Ward P.N., Dowson C.G., Whatmore A.M., Chanter N., Iversen P., Gottschalk M., Slater J.D., Smith H.E., Spratt B.G., Xu J., Ye C., Bentley S., Barrell B.G., Schultsz C., Maskell D.J., and Parkhill J. (2009). Rapid evolution of virulence and drug resistance in the emerging zoonotic pathogen *Streptococcus suis*. *PLoS One.* 4, e6072.

Hollingshead S.K., Fischetti V.A., and Scott J.R. (1986). Complete nucleotide sequence of type 6 M protein of the group A streptococcus. *J. Biol. Chem.* 261, 1677-1686.

Hols P., Hancy F., Fontaine L., Grossiord B., Prozzi D., Leblond-Bourget N., Decaris B., Bolotin A., Delorme C., Dusko Ehrlich S., Guédon E., Monnet V., Renault P., and Kleerebezem M. (2005). New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiol Rev.* 29, 435-463.

Höltje JV, Tomasz A. (1975). Lipoteichoic acid: a specific inhibitor of autolysin activity in Pneumococcus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 72, 1690-1694.

Hu Q., Liu P., Yu Z., Zhao G., Li J., Teng L., Zhou M., Bei W., Chen H., and Jin M. (2010). Identification of a cell wall-associated subtilisin-like serine protease involved in the pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2. *Microbial Pathogenesis.* 48, 103-109.

Hughes M.J.G., Moore J.C., Lane J.D., Wilson R., Pribul P.K., Younes Z.N., Dobson R.J., Everest P., Reason A.J., Redfern J.M., Greer F.M., Paxton T., Panico M., Morris H.R., Feldman R.G., and Santangelo J.D. (2002). Identification of major outer surface proteins of *Streptococcus agalacitae*. *Infect Immun.* 10, 1254–1259.

Husman L.K., Yung D.L., Hollingshead S.K., and Scott J.R. (1997). Role of putative virulence factors of *Streptococcus pyogenes* in mouse models of long-term throat colonization and pneumonia. *Infection and Immunity.* 65,1422–1430.

Idigoras P., Valiente A., Iglesias L., Trieu-Cout P., and Poyart C. (2001). Meningitis due to *Streptococcus salivarius*. *J Clin Microbiol* 39, 3017.

- Igarashi T., Asaga E., and Goto N. (2003). The sortase of *Streptococcus mutans* mediates cell wall anchoring of a surface protein antigen. *Oral Microbiol. Immunol.* 18, 266-269.
- Ilangovan U., Ton-That H., Iwahara J., Schneewind O., and Clubb R.T. (2001). Structure of sortase, the transpeptidase that anchors proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 6056-6061.
- Ji Y., Carlson B., Kondagunta A., and Cleary P.P. (1997). Intranasal immunization with C5a peptidase prevents nasopharyngeal colonization of mice by the group A streptococcus. *Infection and Immunity.* 65, 2080–2087.
- Jinsmaa Y., and Yoshikawa M. (1999). Enzymatic release of neocasomorphin and β -casomorphin from bovine β -casein. *Peptides.* 20, 957–962.
- Jobin M.C., and Grenier D. (2003). Identification and characterization of four proteases produced by *Streptococcus suis*. *FEMS Microbiology Letters.* 220, 113-119.
- Johri A.K., Paoletti L.C., Glaser P., Dua M. Sharma P.K., Grandi G., Rappuoli R. (2006). Group B Streptococcus: global incidence and vaccine development. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 932-942.
- Jonquières R., Bierne H., Fiedler F., Gounon P., and Cossart P. (1999). Interaction between the protein InlB of *Listeria monocytogenes* and lipoteichoic acid: a novel mechanism of protein association at the surface of Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol.* 34, 902-914.
- Juarez Z.E., and Stinson M.W. (1999). An extracellular protease of *Streptococcus gordonii* hydrolyzes type IV collagen and collagen analogues. *Infect Immun.* 67, 271-278.
- Juillard V., Lann H., and Kunji E.R.S., Jeronimus-Stratingh M., Bruins A. R., and Konings W.N. (1995). The extracellular PI-type proteinase of *Lactococcus lactis* hydrolyzes β -Casein into more than one hundred different oligopeptides *J. Bacteriol.* 177, 3472-3478.
- Kang S.S, Kim J.G, Lee T.H, and Oh K.B. (2006). Flavonols inhibit sortases and sortase-mediated *Staphylococcus aureus* clumping to fibrinogen. *BioPharm Bulletin.* 29, 1751-1755.
- Kapur V., Majesky M.W., Li L.L., Black R.A., and Musser J.M. (1993). Cleavage of interleukin 1 beta (IL-1b) precursor to produce active IL-1b by a conserved extracellular cysteine protease from *Streptococcus pyogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 7676-7680.
- Kawamura Y., Hou X.G., Sultana F., Miura H., and Ezaki T. (1995). Determination of 16s rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *Int. J. systematic bacteriol.* 45, 406-408.
- Kerr A.R., Adrian P.V., Estevão S., de Groot R., Alloing G., Claverys J.P, Mitchell T.J, and Hermans P. (2004). The Ami-AliA/AliB permease of *Streptococcus pneumoniae* is involved in nasopharyngeal colonization but not in invasive disease. *Infect. Immun.* 72, 3902-3906.
- Khalid N.M., and Marth E.H. (1990). Proteolytic activity by strains of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei*. *J Dairy Sci.*73, 3068-3076.
- Kharat A.S., and 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, 2758-2765.

- Kim S.W., Chang I.M., and Oh K.B. (2002). Inhibition of the bacterial surface protein anchoring transpeptidase sortase by medicinal plants. *Biosci Biotechnol Biochem.* 66, 2751-2754.
- Kocks C., Gouin E., Tabouret M., Berche P., Ohayon H., and Cossart P. (1992). *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. *Cell.* 68, 521-531.
- Kok J., Leenhouts K.J., Haandrikman A.J., Ledebroer A.M., and Venema G. (1988). Nucleotide sequence of the cell wall proteinase gene of *Streptococcus cremoris* Wg2. *Appl Environ Microbiol.* 54,231-238.
- Korhonen H.J. (2009). Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *J. Functional Foods.* 1,177–187.
- Kumosinski T.F., Browna E.M., and Farrell Jr H.M. (1991). Three-dimensional molecular modeling of bovine caseins: α_{s1} -casein. *J. Dairy Sci.* 74, 2889-2895.
- Kunji E.R.S., Mierau I., Hagting A., Poolman B., and Konings W.N. (1996). The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70, 187-221.
- Laan H., and Konings W.N. (1989). Mechanism of proteinase release from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 3101-3106.
- Labib R.S., Calvanico N.J., and Tomasi T.B. (1978). Studies on extracellular proteases of *Streptococcus sanguis*. Purification and characterization of a human IgA1 specific protease. *Biochim. Biophys. Acta.* 526, 547-559.
- Laemmli U.K., and Favre M. (1973). Maturation of the head of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* 80, 575-579.
- Lahov E., and Regelson W. (1996). Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides. *Food and Chemical Toxicology* 34. 131–145.
- Lalioui L., Pellegrini E., Dramsi S., Baptista M., Bourgeois N., Doucet-Populaire F., Rusniok C., Zouine M., Glaser P., Kunst F., Poyart C., and 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, 3342-3350.
- Lanie J.A., Ng W.L., Kazmierczak K.M., Andrzejewski T.M., Davidsen T.M., Wayne K.J., Tettelin H., Glass J.I., and Winkler M.E. (2007). Genome sequence of Avery's virulent serotype 2 strain D39 of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with that of unencapsulated laboratory strain R6. *J. Bacteriol.* 189, 38-51.
- Lawrence J.G., and Roth J.R. (1999). Genomic flux: genome evolution by gene loss and acquisition. In organisation of the prokaryotic genome. Charlebois, R.L. (ed). Washington, D.C.: American Society for Microbiology, pp. 263-288.
- Lee S.G., Pancholi V., and Fischetti V.A. (2002). Characterization of a unique glycosylated anchor endopeptidase that cleaves the LPXTG sequence motif of cell surface proteins of Gram-positive bacteria. *J. Biol Chem.* 277, 46912-22.

- Lee S.F., and Boran T.L. (2003). Roles of sortase in surface expression of the major protein adhesin P1, saliva-induced aggregation and adherence, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* 71, 676-681.
- Lefébure T., and Stanhope M. J. (2007). Evolution of the core and pangenome of *Streptococcus*: positive selection, recombination, and genome composition. *Genome Biol.* 8, R71.
- Leigh J.A., Egan S.A., Ward P.N., Field T.R., and Coffey T.J. (2010). Sortase anchored proteins of *Streptococcus uberis* play major roles in the pathogenesis of bovine mastitis in dairy cattle. *Veterinary research.* 41,63.
- Len A. C., Harty D. W., and Jacques N. A. (2004). Stress-responsive proteins are upregulated in *Streptococcus mutans* during acid tolerance. *Microbiology.* 150, 1339-1351.
- Letort C., and Juillard V. (2001). Development of a minimal chemically defined medium for the exponential growth of *Streptococcus thermophilus*. *J. Appl. Microbiol.* 91,1023-1029.
- Lévesque C. M., Voronejskaia E., Huang Y. C., Mair R. W., Ellen R. P., and Cvitkovitch, D. G. (2005). Involvement of sortase anchoring of cell wall proteins in biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Infect Immun.* 73, 3773-3777.
- Liu M, Siezen RJ, Nauta A. (2009a). In silico prediction of horizontal gene transfer events in *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* reveals protooperation in yogurt manufacturing. *Appl Environ Microbiol.* 75, 4120-4129.
- Liu F., Du L., Du P., and Huo G. (2009b). Possible promoter regions within the proteolytic system in *Streptococcus thermophilus* and their interaction with the CodY homolog. *FEMS Microbiol Lett.* 2009 Aug;297(2):164-72. Epub 2009 Jun 3.
- Lo C.S., and Hughes C.V. (1996). Identification and characterization of a protease from *Streptococcus oralis* C104. *Oral Microbiol. Immunol.* 11,181–187.
- Lopez-Exposito I., Quiros A., Amigo L., and Recio I. (2007). Casein hydrolysates as a source of antimicrobial, antioxydant and antihypertensive peptides. *Lait.* 87, 241–249.
- Lyon W.R., and Caparon M.G. (2003). Trigger factor-mediated prolyl isomerization influences maturation of the *Streptococcus pyogenes* cysteine protease. *J Bacteriol.* 185, 3661-3667.
- Maeno M., Yamamoto N., and Takano T. (1996). Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J Dairy Sci.* 79, 1316-1321.
- Makarova K., Slesarev A., Wolf Y., Sorokin A., Mirkin B., Koonin E., Pavlov A., Pavlova N., Karamychev V., Polouchine N., Shakhova, V., Grigoriev I., Lou Y., Rohksar D., Lucas S., Huang K., Goodstein D. M., Hawkins T., Plengvidhya V., Welker D., Hughes J., Goh Y., Benson A., Baldwin K., Lee J. H., Diaz-Muniz I., Dosti B., Smeianov, V., Wechter W., Barabote R., Lorca G., Altermann E., Barrangou R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir D., Parker, C., Breidt F., Broadbent J., Hutkins R., O'Sullivan D., Steele J., Unlu G., Saier M., Klaenhammer T., Richardson P., Kozyavkin S., Weimer B. and Mills D. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 15611-15616.
- Markland F.S., and Smith E.L. (1971). Subtilisins: Primary structure, chemical and physical properties. In “the enzymes”, 3rd Ed. (Boyer P.D., ed.), 3, 561-608.

- Marraffini L.A., DeDent A.C., and Schneewind O. (2006). Sortases and the Art of Anchoring Proteins to the Envelopes of Gram-Positive Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 192-221.
- Marri P.R., Hao W., and Golding G. B. (2006). Gene gain and gene loss in streptococcus: is it driven by habitat? *Mol. Biol. Evol.* 23, 2379-2391.
- Matar C., Nadathur S.S., Bakalinsky A.T., and Goulet J. (1997). Antimutagenic Effects of Milk Fermented by *Lactobacillus helveticus* L89 and a Protease-Deficient Derivative. *Journal of Dairy Science.* 80, 1965-1970.
- Martin-Hernandez M.C., Alting A.C., and Exterkate F.A. (1994). Purification and characterization of the mature, membrane-associated cell-envelope proteinase of *Lactobacillus helveticus* L89. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40, 828-834.
- Matéos, A. (2008). Etude protéomique de la microhétérogénéité des caséines a et b équines : identification des variants post-transcriptionnels et de phosphorylation ; identification des sites phosphorylés de la caséine β . Docteur de l'Institut National Polytechnique de Lorraine.
- Mattos-Graner R.O., Jin S., King W.F., Chen T., Smith D.J., and Duncan M.J. (2001). Cloning of the *Streptococcus mutans* gene encoding glucan binding protein B and analysis of genetic diversity and protein production in clinical isolates. *Infect Immun.* 69, 6931-6941.
- Maruyama F., Kobata M., Kurokawa K., Nishida K., Sakurai A., Nakano K., Nomura R., Kawabata S., Ooshima T., Nakai K., Hattori M., Hamada S., and Nakagawa I. (2009). Comparative genomic analyses of *Streptococcus mutans* provide insights into chromosomal shuffling and species-specific content. *BMC Genomics.* 10, 358.
- Mazmanian S.K., Liu G., Jensen E. R., Lenoy E., and Schneewind O. (2000). *Staphylococcus aureus* sortase mutants defective in the display of surface proteins and in the pathogenesis of animal infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 5510-5515.
- Mazmanian S.K., Ton-That H., et Schneewind O. (2001). Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 40, 1049-1057.
- Michaylova M., Isawa K., and Vlachkova L. (2002). Study on yogurt bacteria isolated from plants in Bulgaria. Book of Abstracts of the 7th Symposium on Lactic Acid Bacteria, Egmond aan Zee, The Netherlands, p. A 40.
- Miclo L., Roux E., Genay M., Brusseau-Lorson E., Poirson C., Jameh N., Perrin C and Dary A. (Article soumis 2011) Variability of hydrolysis of β , α_{s1} - and α_{s2} -caseins by 10 strains of *Streptococcus thermophilus* and resulting bioactive peptides. *J. Agric. Food Chem.*
- Miguel M., Recio I., Ramos M., Delgado M.A., and Aleixandre M.A. (2006). Antihypertensive effect of peptides obtained from *Enterococcus faecalis*-fermented milk in rats *J. Dairy Sci.* 89,3352-3359.
- Minkiewicz P., Slangen C. J., Dziuba J., Visser S., and Mioduszevska H. (2000). Identification of peptides obtained via hydrolysis of bovine casein by chymosin using HPLC and mass spectrometry. *Milchwissenschaft.* 55, 14-17.
- Mitchell T.J. (2003). The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. *Nat. Rev. Microbiol.* 1, 219-230.

- Miyakawa H., Kobayashi S., Shimamura S., and Tomita M. (1992). Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus helveticus* LHE-511. *J. Dairy Sci.* 75, 27-35.
- Monnet V., Le Bars D., and Gripon J.C. (1987). Purification and characterization of a cell wall proteinase from *Streptococcus lactis* NCDO 763. *J. Dairy Res.*, 54, 247-255.
- Monnet V. (2006) *Streptococcus thermophilus*, un streptocoque atypique et sympathique. *Bulletin de la Société Française de Microbiologie.* 21, 23-28.
- Mora D., Maguin E., Masiero M., Parini C., Ricci G., Manichini P. L., and Daffonchio D. (2004). Characterization of urease genes cluster of *Streptococcus thermophilus*. *J Appl Microbiol.* 96, 209-219.
- Mora D., Monnet C., and Daffonchio D. (2005a). Balancing the loss and acquisition of pathogenic traits in food-associated bacteria. *Microbiology.* 151, 3814-3816.
- Mora D., Monnet C., Parini C., Guglielmetti S., Mariani A., Pinus P., Molinari F., Daffonchio D., and Manichini P.L. (2005b). Urease biogenesis in *Streptococcus thermophilus*. *Research in Microbiology* 156, 897-903.
- Morice M., Bracquart P., and Linden G. (1992). Colonial variation and freeze-thaw resistance of *Streptococcus thermophilus*, *J. Dairy Sci.* 75, 1197-1203.
- Navarre W.W. and Schneewind O. (1994). Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTG motif of surface proteins in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 14, 115-121.
- Navarre W W; Daefler S; Schneewind O. (1996). Cell wall sorting of lipoproteins in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 178, 441-446.
- Navarre W.W., Schneewind O. (1999). Surface proteins of Gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 174-229.
- Ng-Kwai-Hang K.F., and E. M. Kroeker. E.M. (1984). Rapid separation and quantification of major caseins and whey proteins of bovine milk by polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Dairy Sci.* 67, 3052-3056.
- Nielsen J.B., and Lampen J.O. (1982). Glyceride-cysteine lipoproteins and secretion by Gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 152, 315-322.
- Nobbs A. H., Vajna R.M., Johnson J.R., Zhang Y., Erlandsen S.L., Oli M.W., Kreth J., Brady L.J., and Herzberg M.C. (2007). Consequences of a sortase A mutation in *Streptococcus gordonii*. *Microbiology.* 153, 4088-4097.
- Nobbs A.H., Lamont R.J., and Jenkinson H.F. (2009). Streptococcus adherence and colonization. *Microbiol Mol Biol Rev.* 73, 407-450.
- Oh K.B., Mar W., Kim S., Kim J.Y., Oh M.N., Kim J.G., Shin D., Sim C.J., and Shin J. (2005). Bis(indole) alkaloids as sortase A inhibitors from the sponge *Spongosorites* sp. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 15, 4927-4931.
- Ong L., Henriksson A., and Shah N.P. (2007). Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity in Cheddar cheeses made with the addition of probiotic *Lactobacillus casei* sp., *Lait* 87, 149-165.

- Ong L., and Shah N.P. (2008). Release and identification of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides as influenced by ripening temperatures and probiotic adjuncts in Cheddar cheeses. *LWT - Food Science and Technology*. 41, 1555-1566.
- Ono H., Yamamoto N., Maeno M., Takano T., and Momose H. (1997). Purification and characterization of a cell-wall associated proteinase of *Lactobacillus helveticus* CP53, *Milchwissenschaft*. 52, 373-377.
- Osaki M., Takamatsu D., Shimoji Y., and Sekizaki T. (2002). Characterization of *Streptococcus suis* genes encoding proteins homologous to sortase of Gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 184, 971-982.
- Otte J., Lenhard T., Flambard B., and Sørensen K.I. (2011). Influence of fermentation temperature and autolysis on ACE-inhibitory activity and peptide profiles of milk fermented by selected strains of *Lactobacillus helveticus* and *Lactococcus lactis*. *International Dairy Journal*. 21, 229-238.
- Oxaran V., Ledue-Clier F., Longin C., Herry J. M., Briandet R., Juillard V., and Piard J. C. (2010). Rôles des sortases A et C de *Lactococcus lactis* dans l'oligomérisation de pilines. 17^{ème} Colloque du CBL. Nancy. France.
- Park B.S., Kim J.G., Kim M.R., Lee S.F., Takeoka G.R., Oh K.B., and Kim J.H. (2005). *Curcuma longa* L. Constituents inhibit sortase A and *Staphylococcus aureus* cell adhesion to fibronectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 9005-9009.
- Pastar I., Tonic I., Golic N., Kojic M., van Kranenburg R., Kleerebezem M., and Topisirovic L., and Jovanovic G. (2003). Identification and genetic characterization of a novel proteinase, PrtR, from the human isolate *Lactobacillus rhamnosus* BGT10. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5802-5811.
- Pastar I., Fira D., Strahinic I., Krstic K., Begovic J., Topisirovic L., and Jovanovic G. (2006). Analysis of the presence of prtR proteinase gene in natural isolates of *Lactobacillus rhamnosus*. *Folia Microbiol (Praha)*. 51, 535-540.
- Paterson G.K., and Mitchell T.J. (2004). The biology of Gram-positive sortase enzymes *Trends Microbiol.* 12, 89-95
- Paterson, G. K. and Mitchell, T. J. (2006). The role of *Streptococcus pneumoniae* sortase A in colonisation and pathogenesis. *Microbes Infect.* 8, 145-153.
- Peacock S.J., Lina G., Etienne J., and Foster T.J. (1999). *Staphylococcus schleiferi* subsp. *schleiferi* expresses a fibronectin-binding protein. *Infect Immun.* 67, 4272-4275.
- Pederson J.A., Mileski G.J., Weimer B.C., Steele J.L. (1999). Genetic characterization of a cell envelope-associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *J. Bacteriol.* 181, 4592-4597.
- Peng S.B., Wang L., Moomaw J., Peery R.B., Sun P.M., Johnson R.B., Lu J., Treadway P., Skatrud P.L., and Wang Q.M. (2001). Biochemical characterization of signal peptidase I from Gram-positive *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 183, 621-627.
- Perkins D.N., Pappin D.J., Creasy D.M., and Cottrell J.S. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*. 20, 3551-3567.

- Pihlanto-Leppala A., Rokka, T., and Korhonen H. (1998). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. *Int. Dairy J.*, 8, 325–331.
- Plaut A.G., Genco R.J., and Tomasi T.B. (1974). Isolation of an enzyme from *Streptococcus sanguis* which specifically cleaves IgA. *J. Immunol.* 113, 289-291.
- Poyart C., Quesne G., Coulon S., Berche P., and Trieu-Cuot P. (1998). Identification of streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase. *J. Clin Microbiol.* 36,41-47.
- Race P.R., Bentley M.L., Melvin J.A., Crow A., Hughes R.K., Smith W.D., Sessions R.B., Kehoe M.A., McCafferty D.G., and Banfield M.J. (2009). Crystal structure of *Streptococcus pyogenes* sortase A: Implications for sortase mechanism. *J. Biol. Chem.* 284: 6924-6933.
- Rasic J.L., and Kurmann J.A. (1978). Fermented fresh milk products. Vol. 1. Yogurt: Scientific Grounds, T., Manufacture and Preparations (ed): Technical Dairy Publishing House, Copenhagen, DK.
- Rasmussen M., Muller H.P., and Bjorck L. (1999). Protein GRAB of *Streptococcus pyogenes* regulates proteolysis at the bacterial surface by binding 2-macroglobulin. *J. Biol. Chem.* 274, 15336-15344.
- Raulo S.M., Sorsa T., Tervahartiala T., Latvanen T., Pirila E., Hirvonen J., and Maisi P. (2002). Increase in milk metalloproteinase activity and vascular permeability in bovine endotoxin-induced and naturally occurring *Escherichia coli* mastitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 85, 137-145.
- Raz A., and Fischetti V.A. (2008). Sortase A localizes to distinct foci on the *Streptococcus pyogenes* membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105. 18549-18554. .
- Rogers A.H., Zilm P.S., Pfenning A. L., and Gully N.J. (1990). Some aspects of protease production by a strain of *Streptococcus sanguis*. *Oral Microbiol. Immunol.* 5, 72-76.
- Rul F., Monnet V., and Gripon J. C., (1994). Purification and characterization of a general aminopeptidase (St-PepN) from *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* CNRZ 302. *J. Dairy Sci.* 77, 2880-2889.
- Rul F., Gripon J.C., and Monnet V. (1995). St-PepA, a *Streptococcus thermophilus* aminopeptidase with high specificity for acidic residues. *Microbiology.* 141, 2281–2287.
- Rul F., and Monnet V. (1997). Presence of additional peptidases in *Streptococcus thermophilus* CNRZ 302 compared to *Lactococcus lactis*. *J Appl. Microbiol.* 82, 695-704.
- Ryhänen E.L., Pihlanto-Leppälä A., and Pahkala E. (2001). A new type of ripened, lowfat cheese with bioactive properties. *Int. Dairy J.* 11, 441–447.
- Saito T., Nakamura T., Kitazawa H., Kawai Y., and Itoh T. (2000). Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese, *J. Dairy Sci.* 83, 1434–1440.
- Sambrook J., Fritsch E. F., and Maniatis T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual (2nd ed.). Cold Spring Harbor, New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory.

- Sandre C., Gleizes A., Forestier F., Gorges-Kergot R., Chilmonczyk S., Léonil J., Moreau M.C., and Labarre C. (2001). A peptide derived from bovine beta-casein modulates functional properties of bone marrow-derived macrophages from germfree and human flora-associated mice. *J Nutr.* 131, 2936-2942.
- Sanogo D., Paquet D., Aubert F., and Linden G. (1989). Purification of α_{s1} -casein by fast protein liquid chromatography. *J Dairy Sci.* 72, 2242-2246.
- Sass D.A., Connelly S.A., and Ahmad J. (2006). *Streptococcus salivarius* bacteremia in a cirrhotic patient with neutropenia postesophageal variceal ligation. *Journal of Clinical Gastroenterology*: 40, 7. 654-655.
- Savijoki K., Ingmer H., and Varmanen P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* 71, 394-406.
- Schechter I., and Berger A. (1967). On the size of the active site in protease. I. Papain. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 27, 157-162.
- Schleifer K.H., Ehrmann M., Krusch U. and Neve H. (1991). Revival of the species *Streptococcus thermophilus* (ex Orla-Jensen, 1919) nom. rev. *System. Appl. Microbiol.* 14, 386-388.
- Schneewind O., Model P., and Fischetti V.A. (1992). Sorting of protein A to the staphylococcal cell wall. *Cell.* 70, 267-281.
- Scolari G., Vescovo M., Zacconi C., and Vescovi F. (2006). Extraction and partial characterization of proteolytic activities from the cell surface of *Lactobacillus helveticus* Zuc2. *J. Dairy Sci.* 89, 3800-3809.
- Sela S., Aviv A., Tovi A., Burstein I., Caparon M.G., and Hanski E. (1993). Protein F: an adhesin of *Streptococcus pyogenes* binds fibronectin via two distinct domains. *Mol. Microbiol.* 10,1049-1055.
- Shahbal S., Hemme D., and Desmazeaud M. J. (1991). High cell wall-associated proteinase activity of some *Streptococcus thermophilus* strains (H-strains) correlated with a high acidification rate in milk. *Lait.* 71, 351-357.
- Shahbal S., Denis H., and Pierre R. (1993). Characterization of a cell envelope-associated proteinase activity from *Streptococcus thermophilus* H-Strains. *Appl Environ Microbiol.* 59, 177-182.
- Shammet K.M., Brown R.J., and McMahon D.J. (1992). Proteolytic activity of proteinases on macropeptide isolated from kappa-casein. *J. Dairy Sci.* 75, 1380-1388.
- Shelver D., and Bryan J.D. (2008). Expression of the *Streptococcus agalactiae* virulence-associated protease CspA in a soluble, active form utilizing the Gram-positive host, *Lactococcus lactis*. *J. Biotechnol.* 136, 129-134.
- Shet A., and Ferrieri P. (2004). Neonatal and maternal group B streptococcal infections: a comprehensive review. *Indian J. Med.Res.* 120, 141-150.
- Shihata A., and Shah N.P. (2000). Proteolytic profiles of yogurt and probiotic bacteria. *Int. Dairy J.* 10, 401-408.
- Shimizu M., Lee S. W., Kaminogawa S., and Yamauchi K. (1984). Emulsifying properties of an N-terminal peptide obtained from the peptic hydrolyzate of α_{s1} -casein. *J. Food Sci.* 49, 1117-1120.

- Shimomura Y., Okumura K., Murayama S.Y., Yagi J., Ubukata K., Kirikae T., and Miyoshi-Akiyama T. (2011). Complete genome sequencing and analysis of a Lancefield group G *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* strain causing streptococcal toxic shock syndrome (STSS). *BMC Genomics*. 11,12-17.
- Siezen R.J. (1999). Multi-domain, cell-envelope proteinases of lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenhoek*. 76, 139-155.
- Silva S.V., Pihlanto A., and Malcata F.X. (2006). Bioactive peptides in ovine and caprine cheeselike systems prepared with proteases from *Cynara cardunculus*, *J. Dairy Sci.* 89, 3336–3344.
- Straus D.C., Mattingly S.J., and Milligan T. W. (1977). Production of extracellular material by streptococci associated with subacute bacterial endocarditis. *Infect. Immun.* 17, 148-156.
- Straus D.C. (1982). Protease production by *Streptococcus sanguis* associated with subacute bacterial endocarditis. *Infect. Immun.* 38, 1037-1045.
- Sun Z., Chen X., Wang J., Zhao W., Shao Y., Wu L., Zhou Z., Sun T., Wang L., Meng H., Zhang H., Chen W. (2011). Complete genome sequence of *Streptococcus thermophilus* strain ND03. *J. Bacteriol.* 193, 793-794.
- Tamime A.Y., and Deeth H.C. (1980). Yogurt: technology and biochemistry. *J. Food Protect.* 43, 939-977.
- Tauzin J., Miclo L., and Gaillard J.L. (2002). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from tryptic hydrolysate of bovine α_{S2} -casein. *FEBS Lett.* 531, 369-374.
- Tauzin J.; Miclo L., Roth S., Mollé D., Gaillard J.L. (2003). Tryptic hydrolysis of bovine α_{S2} -casein: identification and release kinetics of peptides. *International Dairy Journal*. 13, 15-27.
- Terzaghi B.E., and Sandine W.R. (1975). Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied Microbiology*. 29, 807–813.
- 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., Fraser C.M. (2001). Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science*. 293, 498-506.
- Tettelin H. (2004). Streptococcal genomes provide food for thought. *Nat Biotechnol.* 22, 1523-1524.
- Ton-That H., Marraffini A., Schneewind O. (2004). Protein sorting to the cell wall envelope of Gram-positive bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1694, 269- 278.
- Tsakalidou E., Anastasiou R., Papadimitriou K., Manolopoulou E., and Kalantzopoulos G. (1998). Purification and characterisation of an intracellular X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 4. *J. Biotechnol.* 59, 203-211.

- Tsakalidou E., Anastasiou R., Vandenberghe I., Van Beeumen J., and Kalantzopoulos G.. (1999). Cell-wall-bound proteinase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ACA-DC 178: characterization and specificity for β -casein. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2035-2040.
- van de Guchte M., Kodde J., Vander Vossen J. M. B. M., Kok J., and Venema G. (1990). Heterologous gene expression in *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* : synthesis, secretion, and processing of the *Bacillus subtilis* neutral protease. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2606-2611.
- Vanier G., Sekizaki T., Domínguez-Punaro M.C., Esgleas M., Osaki M., Takamatsu D., Segura M., and Gottschalk M. (2008). Disruption of *srtA* gene in *Streptococcus suis* results in decreased interactions with endothelial cells and extracellular matrix proteins. *Vet Microbiol.* 127, 417-424.
- Visser S., Exterkate F.A., Slangen C.J., and de Veer G.J.C. (1986). Comparative study of action of cell wall proteinases from various strains of *Streptococcus cremoris* on bovine α_{s1} -, β -, and κ -casein. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 1162-1166.
- Visser S., Slangen C.J., Robben A.J.P.M., van Dongen W., Heerma W., and Haverkamp J. (1994). Action of a cell wall proteinase (CEPIII-type) from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM1 on bovine κ -casein. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 644-651.
- Wang P.Z., and Novick R.P. (1987). Nucleotide sequence and expression of the beta-lactamase gene from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258 in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 169, 1763-1766.
- Wang C., Li M., Feng Y., Zheng F., Dong Y., Pan X., Cheng G., Dong R., Hu D., Feng X., Ge J., Liu D., Wang J., Cao M., Hu F., and Tang J. (2009). The involvement of sortase A in high virulence of STSS-causing *Streptococcus suis* serotype 2. *Arch Microbiol.* 191, 23-33.
- Ward P.N., Holden M.T., Leigh J.A., Lennard N., Bignell A., Barron A., Clark L., Quail M.A., Woodward J., Barrell B.G., Egan S.A., Field T.R., Maskell D., Kehoe M., Dowson C.G., Chanter N., Whatmore A.M., Bentley S.D., and Parkhill J. (2009). Evidence for niche adaptation in the genome of the bovine pathogen *Streptococcus uberis*. *BMC Genomics.* 10, 54.
- Welch R.A., Burland V., Plunkett G., 3rd, Redford P., Roesch P., Rasko D., Buckles E.L., Liou S.R., Boutin A., Hackett J., Stroud D., Mayhew G.F., Rose D.J., Zhou S., Schwartz D.C., Perna N.T., Mobley H.L., Donnenberg M.S., and Blattner F.R. (2002). Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 17020-17024.
- Whiting G. G., Evans J. T., Patel S., and Gillespie S. H. (2002). Purification of native α -enolase from *Streptococcus pneumoniae* that binds plasminogen and is immunogenic. *J. medic. microbiol.* 51, 837-843.
- Xu P., Ge X., Chen L., Dou Y., Wang X., Patel J.R., Trinh M., Evans K., Stone V., Kitten T., Bonchev D., and Buck G. (2007). Genome of the opportunistic pathogen *Streptococcus sanguinis*. *J. Bacteriol.* 189, 3166–3175.
- Yamaguchi M., Terao Y., Ogawa T., Takahashi T., Hamada S., and Kawabata S. (2006). Role of *Streptococcus sanguinis* sortase A in bacterial colonization. *Microbes Infect.* 8, 2791-2796.
- Yamamoto N., Akino A., and Takano T. (1994). Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Dairy. Sci.* 77, 917-922.

Yates J.R. (2004). Mass spectral analysis in proteomics. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 33, 297-316.

Yates J.R., Ruse C.I., and Nakorchevsky A. (2009). Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 11, 49-79.

Zahraa N. (2010). Le peptide κ -CN(f106-109) du lait : propriétés nutritionnelles, biologiques et techno-fonctionnelles. Mémoire de M2, UHP Nancy 1.

Zevaco C., and Gripon J.C. (1988). Properties and specificity of a cell-wall proteinase from *Lactobacillus helveticus*. *Lait*. 68, 393-408.

Liste des travaux

1) Publication :

Release of the cell-enveloppe protease PrtS in the growth medium of *Streptococcus thermophilus* 4F44

O. K. CHANG., C. PERRIN., W.GALIA., F. SAULNIER., L. MICLO., E. ROUX., A. DRIOU., G. HUMBERT and A. DARY (2011) *International Dairy Journal*.

2) Communications affichées par voie d'affichage

Mise en évidence d'une endorprotéase extracellulaire chez *Streptococcus thermophilus* 4F44.

Oun Ki CHANG, Clarisse PERRIN, Alain DRIOU, Wessam GALIA, Gérard HUMBERT, Laurent MICLO et Annie DARY

Séminaire de l'Ecole doctorale RP2E (2009), 15 Janvier, UHP Nancy. France.

Existence d'une forme extracellulaire de prts chez *Streptococcus thermophilus* 4F44.

Oun Ki CHANG, Clarisse PERRIN, Franck SAULNIER, Alain DRIOU, Wessam GALIA, Gérard HUMBERT, Laurent MICLO et Annie DARY

16^{ème} Colloque du Club des Bactéries Lactiques (2009,) 27-29 Mai, TOULOUSE, France.

Caractérisation d'une forme extracellulaire soluble de la protéase PrtS chez *Streptococcus thermophilus* 4F44

Mise en évidence et détermination de ses sites de coupure sur les caséines

Parmi les 30 souches de *Streptococcus thermophilus* du laboratoire, seule la souche 4F44 a excrété une protéase dans son milieu de culture.

L'utilisation de substrats synthétiques spécifiques a montré que cette activité notamment détectée en zymographie sur caséine correspond effectivement à la protéase libérée et ne résulte pas de la présence dans le milieu de protéases intracellulaires due à une lyse cellulaire. D'après le séquençage N-terminal (dégradation récurrente d'EDMAN), cette enzyme soluble chez la souche 4F44 est l'enzyme PrtS retrouvée sous deux formes (non mature et mature). Cette protéase a été retrouvée chez cette souche à la fois ancrée (60%) et soluble (40%).

Le gène *prtS* de la souche 4F44 a été déterminé, la séquence protéique déduite de ce gène est peu différente de celle des souches LMD-9 (97% identité), CNRZ385 (98% identité), JIM8232 (96% identité) et *S. suis* (97% identité). Chez les autres souches exprimant cette protéase, elle n'est retrouvée qu'ancrée. Dans la séquence protéique de cette enzyme, le domaine d'ancrage contenant un motif LPNTG (reconnu par la sortase A permettant l'ancrage) est bien conservé comme chez les autres souches LMD-9, CNRZ385 et *S. suis* ; ainsi cette protéase PrtS serait bien ancrée au peptidoglycane de la paroi par la sortase A (SrtA).

Chez la souche 4F44, l'absence d'une duplication imparfaite d'une séquence peptidique au niveau du prodomaine de PrtS (supposée importante pour la maturation de la protéine) pourrait expliquer la libération partielle de la protéase, en effet la souche LMD-9 qui présente cette duplication possède sa protéase PRtS uniquement sous forme ancrée.

La comparaison de la séquence primaire de la sortase déduite du gène *srtA*, chez les souches 4F44, ND03, LMD-9, PB180, PB302 et CNRZ307, a montré que les sites catalytique (Arg, Cys, His) et actif (Gly, Lys, Ser, Ala, Thr, Ala) sont bien conservés. Six résidus d'acides aminés sont différents pour la sortase de la souche 4F44 par rapport aux autres souches. Parmi ces six résidus, le remplacement du résidu isoleucyl (I₂₂₂), important pour la bonne orientation du motif d'ancrage LPNTG au niveau du site actif, par le résidu valyl (V₂₂₂) chez la souche 4F44 pourrait entraîner la libération partielle de PrtS. La séquence C-terminale de la protéase PrtS soluble de la souche 4F44 qui contient le domaine LPNTG a été caractérisée : les 2 peptides tryptiques « QVTQLPNTGENDTK » et « QVTQLPNTGENDTKYYLVPGVIIIGLGTLLVSIRR » ont été identifiés en spectrométrie de masse MS/MS (ESI-FT-ICR). La présence de ces 2 peptides contenant le motif LPNTG intact indique que la liaison TG (cible de l'activité endopeptidasique de SrtA) n'est pas hydrolysée.

La spécificité de coupure de PrtS de la souche 4F44 a été étudiée sur les protéines du lait : l'utilisation du surnageant de culture contenant la protéase PrtS soluble a montré que la caséine β est préférentiellement hydrolysée par rapport aux autres protéines. Les sites de clivage sur les différentes caséines ont montrés une large spécificité de coupure vis-à-vis de résidus polaires non chargés et de résidus positivement chargés et de résidus hydrophobes encombrants (Ala, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Val, Ser, Thr, Asn, Gln, Arg, His et Lys en position P1). Globalement 33 peptides à activité biologique sont obtenus avec cette enzyme ; ces peptides sont inhibiteurs de l'ECA, mitogènes, opioïdes, immunomodulants, antibactériens, antioxydants et/ou antimutagènes.

Mots clés : *Streptococcus thermophilus*, protéase PrtS, forme soluble, sortase A, sites de coupure des caséines, peptides bioactifs.

Characterization of a soluble form of extracellular protease PrtS in *Streptococcus thermophilus* 4F44 and determination of cleavage sites on caseins

Among the 30 strains of *Streptococcus thermophilus* in our laboratory collections, only the 4F44 strain releases a protease in the medium.

The use of synthetic substrates showed that this activity corresponds to the released protease as in the case of detection by zymography with caseine as a substrate and this activity does not results from the presence of intracellular protease due to cell lysis. According to N-terminal sequencing, this soluble form of protease is the protease PrtS in two forms (non mature and mature). These two forms PrtS are found : 60% as anchored to cell wall and 40 % as released in the medium.

The *prtS* gene of the 4F44 strain was sequenced. The protein sequence deduced from the gene is slightly different to those present in the LMD-9 (97% identity), CNRZ385 (98% identity), JIM8232 (96% identity) strains and *S. suis* (97% identity). The protein sequence of the anchor domain including the LPNTG motif (recognized by sortase A allowing anchoring) is well conserved as in the other LMD-9, CNRZ385 strains and *S. suis* ; so this protease PrtS might be well anchored to peptidoglycan of the cell wall by sortase A (SrtA).

In the 4F44 strain, the absence of an imperfect duplication of a peptide sequence at prodomain of PrtS (possibly important for the maturation of this protease PrtS) could explain the partial liberation of protease, furthermore, the LMD-9 strain which presents this duplication possess the protease PrtS only the anchored form.

Comparison of protein sequence deduced from the *srtA* gene in 4F44, ND03, LMD-9, PB180, PB302 and CNRZ307 strains showed that the residues of the catalytic (Arg, Cys, His) and active (Gly, Lys, Ser, Ala, Thr, Ala) sites are well conserved. Six amino acids are different for the strain 4F44 in comparison to other strains. Among these 6 amino acids, the isoleucine residue (I₂₂₂) is important for correct positioning of the LPNTG anchor motif at active sites of SrtA. In the 4F44 strain, isoleucine residue (I₂₂₂) is replaced by a valine residue (V₂₂₂) possibly leading to the partial liberation of PrtS. The C-terminal sequence of soluble PrtS which contains the LPNTG anchor motif was analyzed. Two trypsinic peptides, « QVTQLPNTGENDTK » and « QVTQLPNTGENDTKYYLVPGVHIGLGTLLVSIRR », have been identified by MS/MS (ESI-FT-ICR). The presence of these two peptides containing the intact LPNTG motif indicates that the peptide bond of T and G (target of endopeptidasic activity of Srt A) does not hydrolyze.

The cleavage specificity of PrtS of the 4F44 strain was studied on milk proteins: the use of culture supernatant containing the soluble PrtS showed that β -casein is preferentially degraded in comparison to other proteins. The cleavage sites on different caseins have shown a broad specificity of cleavage against non-charged polar residues, positive charged residues or bulky hydrophobic residues (Ala, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Val, Ser, Thr, Asn, Gln, Arg, His and Lys at position P1). Globally, 33 bioactive peptides are obtained with this PrtS ; these peptides are antihypertensives, mitogenics, oipoids, immunomodulators, antimicrobials, antioxidants or/and antimutagens.

Keywords: *Streptococcus thermophilus*, protease PrtS, soluble form, sortase A, cleavage sites of caseins, bioactive peptides.

Nancy-Université
INPL

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur Jean-Marc CHOBERT, Directeur de Recherche, INRA de Nantes

Monsieur Jean-Luc GAILLARD, Professeur des Universités, IUT de Caen

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur CHANG Oun Ki

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Caractérisation d'une forme extracellulaire soluble de la protéase PrtS chez
Streptococcus thermophilus 4F44 : Mise en évidence et détermination de ses sites de
coupure sur les caséines. "**

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Sciences Agronomiques** »

Fait à Vandoeuvre, le 14 octobre 2011

Le Président de l'I.N.P.L.,

F. LAURENT



Institut National Polytechnique de Lorraine
inpl@inpl-nancy.fr | www.inpl-nancy.fr

2 av. de la Forêt de Haye | BP 3
54501 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex
FRANCE
Tél. : +33(0)3 83 59 59 59
Fax : +33(0)3 83 59 59 55