



**HAL**  
open science

# Caractérisation de la variabilité du système protéolytique de surface de la bactérie lactique *Streptococcus thermophilus*

Wessam Galia

► **To cite this version:**

Wessam Galia. Caractérisation de la variabilité du système protéolytique de surface de la bactérie lactique *Streptococcus thermophilus*. Sciences agricoles. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2011. Français. NNT : 2011INPL053N . tel-01749494

**HAL Id: tel-01749494**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749494>**

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](mailto: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.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 21 septembre 2011 par

**Wessam GALIA**

**Caractérisation de la variabilité du système protéolytique de surface de la  
bactérie lactique *Streptococcus thermophilus***

**Membres du jury**

Rapporteurs :

Mme Christine DELORME, Chargée de recherche, INRA, Jouy en Josas

Mme Véronique MONNET, Directrice de recherche, INRA, Jouy en Josas

Examineurs

Mme Nathalie DESMASURES Professeur, Université de Caen

Mme Nathalie LEBLOND-BOURGET, Professeur, Nancy-université

Mme Annie DARY, Professeur, Nancy-université (Directrice de thèse)

Mme Clarisse PERRIN, Maître de conférences, Nancy-université (Co-directrice)

Unité de Recherche Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux  
Equipe Protéolyse et Biofonctionnalité des Protéines et Peptides  
Faculté des Sciences et Techniques, Université Henri Poincaré, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy



## Avant-Propos

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

Je remercie en premier lieu mes responsables de thèse, Pr. Annie Dary-Mourot et Dr. Clarisse Perrin.

Annie, merci de m'avoir proposé de travailler sur ce sujet de thèse et de m'avoir fait confiance pour débiter cette nouvelle thématique, vos précieux conseils m'ont permis d'avancer. Je tiens également à vous remercier pour votre soutien scientifique mais aussi moral et bien sûr pour tout ce que vous m'avez appris, surtout la rigueur.

Clarisse, merci de m'avoir accordé votre confiance tout au long de cette aventure. Je vous remercie également pour l'intérêt que vous avez accordé avec dynamisme à ce travail, enfin merci pour tout ce que j'ai appris à vos côtés. De plus, je me demande qui va pouvoir me remplacer pour les longs débats quasi-journaliers et les éclats de rire, vous allez enfin rentrer chez vous un peu avant le journal de 20 h.

Mes remerciements s'adressent aux rapporteurs et membres de la commission d'examen qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail :

- Madame Christine DELORME, Chargée de recherche à l'INRA de Jouy en Josas
- Madame Nathalie DESMASURES Professeur, Université de Caen.
- Madame Nathalie LEBLOND-BOURGET, Professeur, Nancy-université
- Madame Véronique MONNET, Directrice de recherche à l'INRA de Jouy-en-Josas

Je tiens à adresser un immense merci au directeur de l'unité de recherche Pr. Guido RYCHEN de m'avoir permis de réaliser ces travaux de recherche au sein de l'URAFPA (Unité de Recherche Animal et Fonctionnalité des Produits Animaux) de Nancy Université.

Je tiens aussi à remercier les membres de l'équipe PB2P "Protéolyse-Biofonctionnalité des Protéines et Peptides", à savoir Céline CAKIR-KIEFER, Catherine CORBIER, Alain DRIOU, Magali GENAY-BERNARD, Jean-Michel GIRARDET, Gérard HUMBERT, Katy POIRET, Anne LAGRANGE, Yves LE ROUX, Emilie LORSON, Laurent MICLO, Chantal POIRSON, Yvonne ROUSSEL, Émeline ROUX, Franck SAULNIER qui ont toujours été de bons conseils avec moi et qui ont su remplacer ma famille. Après mon départ, vous pourrez

dire adieu aux longs séminaires interminables, j'aurais aimé vous dire qu'à vos côtés j'ai appris à faire court mais je ne pense pas avoir changé...

Un travail de thèse ne se fait jamais sans des compagnons de labo.

Je tiens spécialement à remercier Delphine DUFOUR de m'avoir guidé dès mon arrivée et Oun Ki CHANG. Oun Ki, nous avons avancé ensemble et je te souhaite bon courage pour la fin de ta thèse.

Merci à Nazir AHMAD, François BAGLINIERE, Zeeshan HAFEEZ, Maïra JUNJUA, Xavier LECOMTE, Aurélie MATÉOS et Faïza ZIDANE pour votre amitié et pour votre bonne humeur. A ceux qui ne sont pas encore Docteur, je vous souhaite bon courage, beaucoup de résultats et de publications.

Je remercie particulièrement ma collègue de bureau, de recherche Nawara JAMEH, qui est en premier lieu ma femme, elle a su me supporter durant ces derniers mois. Nawara, tu as toujours su me donner sans rien attendre en retour. Je viens à mon tour t'assurer mon soutien pour les prochains jours, car pour toi maintenant l'échéance approche.

Je pense fort à toute ma famille, particulièrement mes parents, mes frères et sœurs, votre absence me pèse, j'aurais aimé vous avoir à mes côtés et vous remercie pour votre soutien.

Je remercie enfin, la Syrie mon pays, de m'avoir donné cette chance de continuer mes études en France et je remercie la France de m'avoir accueilli.

## Table des matières

Table des matières .....	5
Abréviations .....	9
Table des Figures .....	11
Table des Tableaux.....	13
I. Synthèse Bibliographique .....	15
1. Les bactéries lactiques.....	16
1.1. Caractéristiques générales des bactéries lactiques .....	16
1.2. Classification et taxonomie .....	16
2. Les Streptocoques .....	18
2.1. Positionnement de <i>St. thermophilus</i> chez les streptocoques .....	18
2.2. Caractéristiques du génome de <i>St. thermophilus</i> .....	20
2.3. Adaptation de <i>St. thermophilus</i> dans sa niche écologique (le lait).....	22
2.3.1. L'évolution du génome de <i>St. thermophilus</i> .....	22
2.3.1.1. Perte des fonctions pendant l'évolution de <i>St. thermophilus</i> .....	23
2.3.1.2. Perte des gènes liés à la virulence chez <i>St. thermophilus</i> .....	24
2.3.2. Intégration de nouvelles fonctions chez <i>St. thermophilus</i> .....	26
2.3.2.1. Des éléments génétiques contribuant à l'élaboration du génome de <i>St. thermophilus</i> .....	27
2.3.2.2. Acquisition de nouveaux gènes par transfert horizontal .....	28
3. Le métabolisme azoté chez <i>St. thermophilus</i> .....	29
3.1. Exigences en acides aminés .....	29
• Biosynthèse des acides aminés à chaîne ramifiée (BCAA) chez <i>St. thermophilus</i> .....	30
3.2. Système protéolytique .....	32
3.2.1. Protéase de paroi .....	32
• Caractérisation de PrtS.....	34
• Ancrage de PrtS .....	36
• Variabilité du gène <i>prtS</i> .....	38
• Caractéristiques biochimiques de PrtS de <i>St. thermophilus</i> CNRZ 385.....	39
• Protéase HtrA.....	41
• maturation des protéases chez les bactéries Gram <sup>+</sup> .....	41
3.2.2. Systèmes de transport.....	45
3.2.2.1. Le transport des oligopeptides.....	45
• Caractéristiques des peptides transportés par le système Opp.....	45
• Caractéristique et variabilité génétiques du système de transport Opp .....	46
• Rôle du système Opp dans la nutrition azotée .....	47
• Rôle du système Opp dans la régulation de gènes.....	47
3.2.2.2. Le transport des di et tri peptides .....	50
3.2.2.3. Le transport des acides aminés.....	51
3.2.3. Les peptidases intracellulaires de <i>St. thermophilus</i> .....	52
3.2.3.1. Les endopeptidases de <i>St. thermophilus</i> .....	52
3.2.3.2. Les exopeptidases de <i>St. thermophilus</i> .....	53
3.2.3.2.1. Les aminopeptidases générales .....	53
• L'aminopeptidase PepN.....	53

• L'aminopeptidase PepC .....	53
3.2.3.2.2. Les aminopeptidases spécifiques .....	54
• L'aminopeptidase PepS .....	54
• L'aminopeptidase PepA.....	55
• La X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase PepX.....	55
4. Régulation de l'expression du système protéolytique chez les bactéries.....	57
4.1. Les régulations en réponse à la source de carbone.....	57
4.1.1. Modèle de la répression catabolique chez les bactéries Gram <sup>+</sup> .....	57
4.1.2. Régulation des peptidases par la répression catabolique .....	60
4.2. Les régulations en réponse à la source d'azote .....	62
4.2.1. Mécanisme de régulation par des régulateurs généraux en réponse à la source d'azote .....	62
4.2.1.1. La régulation par Lrp.....	63
4.2.1.1.1. Le régulon Lrp.....	63
4.2.1.1.2. La modulation de la régulation par Lrp.....	64
4.2.1.2. La régulation par CodY.....	65
4.2.1.2.1. Le régulon CodY.....	65
4.2.1.2.2. Les signaux dans la régulation par CodY.....	68
4.2.2. Régulation des composants du système protéolytique de <i>St. thermophilus</i> .....	71
• Expression du gène <i>prtS</i> au cours de la croissance.....	72
II. Objectifs du travail .....	75
Objectif du travail.....	76
III. Matériels et Méthodes .....	77
1. Souches, milieux et conditions de culture.....	78
1.1. Souches bactériennes utilisées et conditions de conservation.....	78
1.2. Milieux et conditions de culture.....	78
2. Détection d'une activité protéolytique par zymographie .....	79
2.1. Préparation des extraits protéiques bactériens .....	79
2.2. Préparation des échantillons protéiques pour le zymogramme.....	80
2.3. Mise en évidence des protéases par révélation de plages d'hydrolyse .....	80
3. Mise en évidence et mesure de l'activité à l'aide d'un substrat synthétique.....	84
3.1. Récupération des cellules .....	84
3.2. Quantification des activités .....	85
4. Détermination du degré d'acidité Dornic.....	85
5. Extraction d'ADN génomique, réactions de PCR, conditions d'électrophorèse et séquençage .....	86
5.1. Extraction d'ADN génomique .....	86
5.2. Condition standard d'amplification par PCR.....	86
5.3. Electrophorèse d'ADN .....	87
5.4. Séquençage.....	87
6. Analyse de l'expression des gènes .....	92
6.1. Récupération des cellules .....	92
6.2. Extraction et quantification de l'ARN total .....	92
6.3. Préparation des ADN complémentaires .....	93
6.4. Design des amorces .....	94
6.5. PCR en temps réel.....	94
6.6. Quantification des niveaux d'expression .....	94
IV. Résultats.....	97
Chapitre 1 .....	99
Chapitre 1 : Publication n°1 .....	100

Variability and molecular typing of <i>Streptococcus thermophilus</i> strains displaying different proteolytic and acidifying properties.....	100
Chapitre 2 .....	109
Chapitre 2 : Publication n°2 .....	110
Release of the cell-enveloppe protease PrtS in the growth medium of <i>Streptococcus thermophilus</i> 4F44.....	110
2.3. Preparation of a fraction enriched in extracellular PrtS soluble forms .....	114
2.6. DNA extraction -restriction fragment separation and Southern analysis - Polymerase chain reaction (PCR) amplication - DNA sequencing and nucleotide accession numbers	116
Chapitre 3 .....	135
1. Etude de la croissance de <i>St. thermophilus</i> PB302 et PB18O en lait et en milieu M17 ...	136
2. Expression de la protéase PrtS au cours de la croissance des souches PB18O et PB302..	139
2.1. Expression de la protéase PrtS au cours de la croissance des souches PB18O et PB302 en milieu M17 .....	139
2.1.1. Suivi de l'activité protéolytique de surface au cours de la croissance des souches PB18O et PB302 en milieu M17 .....	139
2.1.2. Quantification de l'expression de PrtS à différents stades de croissance des souches PB18O et PB302 en milieu M17 .....	140
2.2. Quantification de l'expression de la protéase PrtS au cours de la croissance des souches PB18O et PB302 en milieu lait .....	145
3. Expression de différents gènes du métabolisme azoté chez <i>St. thermophilus</i> PB18O et PB302 lors de la croissance en milieu M17 ou lait .....	147
3.1. Séquençage des gènes sélectionnés chez les deux souches PB18O et PB302 .....	153
3.2. Etude de l'expression des gènes sélectionnés chez <i>St. thermophilus</i> PB18O et PB302 par RT-PCR en temps réel .....	157
3.2.1. Taux d'expression des gènes sélectionnés au cours de la croissance des souches PB18O et PB302 en milieu M17 .....	158
3.2.2. Expression relative des gènes sélectionnés au cours de la croissance des souches PB18O et PB302 en milieu lait .....	158
4. Conclusion-Discussion.....	163
4.1. Expression de la protéase PrtS au cours de la croissance des souches PB18O et PB302 .....	166
4.2. Variation de l'expression de gènes du métabolisme azoté au cours de la croissance des souches PB302 et PB18O : rôle du régulateur CodY chez <i>St. thermophilus</i> .....	169
4.2.1. Comparaison de l'expression des gènes sélectionnés chez les deux souches PB302 et PB18O .....	170
4.2.2. Quel est le rôle du régulateur CodY chez <i>St. thermophilus</i> : activateur et/ou répresseur ?.....	171
V. Perspectives .....	181
VI. Références Bibliographiques .....	185
VII. Liste des Publications et Communications .....	203



## Abréviations

A : Adénine  
AA : Acide aminé  
ABC : ATP Binding Cassette  
ADN : Acide Désoxyribonucléique  
ADNc : ADN complémentaire  
ARNr16S : Acide Ribonucléique ribosomal de coefficient de sédimentation 16 Sveldberg  
ARNr23S : Acide Ribonucléique ribosomal de coefficient de sédimentation 23 Sveldberg  
ARNm : Acide ribonucléique messenger  
ARNt : Acide Ribonucléique de transfert  
ATCC : American type culture collection  
ATP : Adénosine triphosphate  
BCAA : Branched-Chain Amino Acid  
BL : Bactérie Lactique  
BLAST : Basic Local Aligement Search Tool  
Bis : N, N'- méthylène-bis-acrylamide  
BSA : Sérum albumine bovine  
C : Cytosine  
CcpA : Catabolite control protein A  
CDS : Coding Sequence  
CEP : Cell Envelope Proteinase  
CHAPS : 3-[(3-cholamidopropyl)-diméthylammonio]-1-propanesulfate  
CNRZ : Centre National de recherche zootechnique  
CodY : Control Of Dpp  
ComR : Competence Regulator  
ComS : Competence Signal  
*cre* : Catabolite responsive element  
CSP : Competence stimulating peptide  
Ct : Cycle threshold  
Da : Dalton  
dNTP : Désoxyribonucléotide triphosphate  
DO : Densité optique  
DTT : Dithiothréitol  
FBP : Fructose-1,6-bisphosphate  
EDTA : Ethylène diamine tétra acétique  
EPS : Exopolysaccharides  
GTP : Guanosine triphosphate  
HPr : Histidine-containing phosphocarrier protein  
HTH : Hélice-tour-hélice  
IS : Séquences d'insertion  
ITS : Internal Transcribed Sequence  
Kb : Kilo base  
kDa : kiloDalton  
Lrp : Leucine-Responsive regulatory Protein  
MCD : Milieu Chimiquement Défini  
MCD-Glc : Milieu Chimiquement Défini contenant du glucose  
MCD-Gal : Milieu Chimiquement Défini contenant du galactose  
MLST : Multi Locus Sequence Typing  
Mpb : Méga paire de base  
NAD<sup>+</sup> : Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) oxydé

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide réduit  
ORF: Phase ouverte de lecture (open reading frame)  
PAGE : Electrophorèse en gel acrylamide (polyacrylamide gel electrophoresis)  
pb : Paire de bases  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
pI : Point Isoélectrique  
PMSF : Phénylméthylsulfonylfluorure  
PPIases : Peptidyl-prolyl cis/trans isomérase  
PTS : Phosphotransférase système  
RBS : Ribosome Binding Site  
MM : Masse Moléculaire  
M/V : Rapport masse/volume  
NCBI : National Center for Biological Sequence Analysis  
RT : Reverse Transcription  
RT-PCR : Real time PCR  
SDS : Sodium dodécyl sulfate  
Ssp. : Sous-espèce  
T : Thymine  
TAE : Tris acétate  
TCA : Acide trichloroacétique  
TE : Tris EDTA  
TEMED : N, N, N', N'-tetraméthyleéthylène diamine  
Tris :  $\alpha\alpha\alpha$ -Tris (hydroxyméthyl) méthylamine  
U : Uracile  
UFC : Unité formant colonie  
UV : Ultraviolet  
V/V : Rapport volume/volume

## Table des Figures

Figure 1 : Distances phylogénétiques entre les principaux genres constituant les BL basées sur les séquences des ARNr 16S. Adapté de Schleifer et Ludwig, 1995 (Stiles et Holzapfel, 1997) .....	17
Figure 2 : Représentation schématique de l'analyse comparative des génomes entièrement séquencés de <i>Streptococcus</i> (Lefébure et Stanhope, 2007).....	21
Figure 3 : Voie de biosynthèse des acides aminés à chaîne ramifiée (BCAA) (Garault <i>et al.</i> , 2000).....	31
Figure 4 : Représentation schématique du système protéolytique de <i>St. thermophilus</i> (D'après Monnet 2006) .....	33
Figure 5 : Représentation schématique des différents domaines composants les protéases de parois, selon (Fernandez-Espla <i>et al.</i> , 2000; Savijoki <i>et al.</i> , 2006; Siezen, 1999).....	34
Figure 6 : Représentation schématique des domaines composants la protéase PrtS de <i>St. thermophilus</i> LMD-9, 4F44 et <i>St. suis</i> .....	35
Figure 7 : Mécanisme d'ancrage à la paroi cellulaire des protéines de surface de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	37
Figure 8 : Organisation des gènes codant les sous unités des transporteurs des oligopeptides chez différentes espèces bactériennes .....	48
Figure 9 : Modèle proposé pour l'impact de CcpA sur le métabolisme du lactose chez .....	59
Figure 10 : Modèle présentant la régulation de l'expression de certains gènes du régulon protéolytique de <i>Lc. lactis</i> (Guédon <i>et al.</i> , 2001a, 2001b) .....	70
Figure 11 : Croissance en milieu lait d'une souche de <i>St. thermophilus</i> ne comportant pas (a) ou comportant (b) à sa surface la protéase PrtS (Letort <i>et al.</i> , 2002).....	74
Figure 12 : Suivi de croissance de <i>St. thermophilus</i> PB180 et PB302 en milieu M17 par détermination de la densité cellulaire (mesure de DO à 650 nm) « A » et mesure du pH extracellulaire « B » (PB302 ; PB180 ) .....	137
Figure 13 : Suivi de croissance en lait de <i>St. thermophilus</i> PB180 et PB302 par détermination de la densité cellulaire (mesure de DO à 480 nm) « A » et mesure du pH « B » (PB302 ; PB180 ) .....	138
Figure 14 : Suivi de croissance par détermination de la densité cellulaire (mesure de DO à 650 nm) « A », par mesure du pH « B » et suivi de l'activité protéolytique de surface (C) chez <i>St. thermophilus</i> PB302 ( ) et PB180 ( ) cultivées en milieu M17 .....	141
Figure 15 : Catabolisme du pyruvate par <i>St. thermophilus</i> selon Hols <i>et al.</i> , (2005) et Garault <i>et al.</i> , (2000) .....	151
Figure 16 : Alignement de la séquence de la protéine CodY de <i>St. thermophilus</i> avec les séquences protéiques CodY disponibles dans les banques de données .....	155
Figure 17 : Séquence de la région promotrice du gène <i>ackA</i> de <i>St. thermophilus</i> PB302 et PB180 .....	157
Figure 18 : Log <sub>10</sub> du rapport d'expression de chacun des gènes d'intérêt déterminé chez les souches PB302 et PB180 (PB302/PB180) au début et au milieu de la phase exponentielle de croissance en milieu M17 .....	160
Figure 19 : Log <sub>10</sub> du rapport d'expression de chacun des gènes d'intérêt déterminé chez les souches PB302 et PB180 (PB302/PB180) au milieu et à la fin de la phase exponentielle (début de phase stationnaire de croissance) en milieu M17 .....	161
Figure 20 : Log <sub>10</sub> du rapport d'expression de chacun des gènes d'intérêt déterminé chez les souches PB302 et PB180 (PB302/PB180) au début et au milieu de la phase exponentielle de croissance en lait .....	162

Figure 21 : Log <sub>10</sub> du rapport d'expression de chacun des gènes d'intérêt déterminé chez la souche PB18O cultivée en lait et M17 (lait/M17) au début et au milieu de la phase exponentielle de croissance .....	164
Figure 22 : Log <sub>10</sub> du rapport d'expression de chacun des gènes d'intérêt déterminé chez la souche PB302 cultivée en lait et M17 (lait/M17) au début et au milieu de la phase exponentielle de croissance .....	165
Figure 23 : Log <sub>10</sub> du rapport d'expression de chacun des gènes d'intérêt déterminé chez les souches PB302 et PB18O (PB302/PB18O) au début et au milieu de la phase exponentielle de croissance en milieu M17 .....	172
Figure 24 : Log <sub>10</sub> du rapport d'expression de chacun des gènes d'intérêt déterminé chez les souches PB302 et PB18O (PB302/PB18O) au début et au milieu de la phase exponentielle de croissance en lait .....	173
Figure 25 : Log <sub>10</sub> du rapport d'expression de chacun des gènes d'intérêt déterminé en fin de phase exponentielle (début de phase stationnaire) et en milieu de phase exponentielle (fin/milieu) chez les souches PB18O et PB302 cultivées en milieu M17 .....	176
Figure 26 : Représentation schématique de la potentielle régulation génétique du gène <i>ackA</i> de <i>St. thermophilus</i> PB302 et PB18O .....	178

## Table des Tableaux

Tableau 1 : Exemples de maladies causées par les Streptocoques pathogènes (Cunningham, 2000).....	19
Tableau 2 : Distribution des pseudogènes dans les différentes fonctions cellulaires de.....	24
Tableau 3 : Classification des sortases chez les bactéries à Gram <sup>+</sup> (Comfort et Clubb, 2004; Dramsi <i>et al.</i> , 2005).....	26
Tableau 4 : Comparaison des protéines de surface putatives retrouvées sur les génomes des streptocoques (Bolotin <i>et al.</i> , 2004) .....	27
Tableau 5 : Activité de PrtS de <i>St. thermophilus</i> CNRZ 385 sur différents substrats chromogéniques (Fernandez-Espla <i>et al.</i> , 2000).....	40
Tableau 6 : Activité relative de l'enzyme PepX de <i>St. thermophilus</i> ACA-DC4 sur différents substrats (Tsakalidou <i>et al.</i> , 1997) .....	56
Tableau 7 : Origine des souches de <i>St. thermophilus</i> utilisées dans ce travail .....	78
Tableau 8 : Composition des milieux de culture utilisés .....	79
Tableau 9 : Composition des gels, des tampons d'échantillon et d'électrodes utilisés en électrophorèse SDS-PAGE des protéines .....	81
Tableau 10 : Composition des solutions utilisées pour la révélation de l'activité protéolytique lors d'un zymogramme (D'après Raulo SM. <i>et al.</i> , 2002).....	82
Tableau 11 : Marqueurs protéiques de référence (SDS-PAGE Standards, broad range, Bio-Rad) utilisés pour le zymogramme.....	83
Tableau 12 : Amorces et température utilisées pour la réalisation d'amplification de séquences d'ADN génomiques par la technique de PCR .....	88
Tableau 13 : Séquence et position d'hybridation des amorces utilisées pour la quantification des gènes cibles au cours de cette étude.....	94
Tableau 14 : Activité protéolytique de surface des souches <i>St. thermophilus</i> PB302 et PB180 à différents temps de croissance en milieu M17 .....	142
Tableau 15 : Récapitulatif des valeurs de Ct des gènes $\sigma$ 70/32, <i>gyrA</i> et <i>murE</i> obtenues par PCRq à partir des ADNc des souches PB302 et PB180 cultivées en milieu M17.....	143
Tableau 16 : Evolution des taux <sup>a</sup> d'expression du gène <i>prtS</i> au cours de la croissance des souches PB302 et PB180 en milieu M17 .....	144
Tableau 17 : Comparaison des niveaux <sup>a</sup> d'expression du gène <i>prtS</i> entre les souches PB302 et PB180 en milieu M17.....	144
Tableau 18 : Activité protéolytique de surface retrouvée chez les souches <i>St. thermophilus</i> PB302 et PB180 cultivées en lait .....	145
Tableau 19 : Récapitulatif des valeurs de Ct des gènes $\sigma$ 70/32, <i>gyrA</i> et <i>murE</i> obtenues par PCRq à partir des ADNc issus des souches PB302 et PB180 cultivées en milieu lait .....	146
Tableau 20 : Taux d'expression du gène <i>prtS</i> au cours de la croissance des souches PB302 et PB180* en lait .....	146
Tableau 21 : Comparaison des niveaux d'expression du gène <i>prtS</i> entre les deux souches étudiées (souche PB302/souche PB180*) cultivées en lait .....	147
Tableau 22 : Gènes dont l'expression a été étudiée au cours de la croissance des souches PB180 et PB302 .....	149
Tableau 23 : Localisation et séquence des boîtes <i>cre</i> « catabolite responsive element » identifiées au niveau des gènes potentiellement régulés par CcpA chez <i>St. thermophilus</i> PB180 et PB302 .....	156
Tableau 24 : Comparaison des niveaux d'expression des gènes étudiés entre les deux souches PB180 et PB302 (PB302/PB180*) dans les deux milieux (milieu M17 et lait).....	159



# **I. Synthèse Bibliographique**

# 1. Les bactéries lactiques

## 1.1. Caractéristiques générales des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des microorganismes relativement hétérogènes d'un point de vue morphologique et physiologique. Leurs principales caractéristiques sont : d'être Gram<sup>+</sup>, immobiles, asporogènes, anaérobies mais aérotoleérantes, de ne posséder ni catalase (à l'exception de *Lactobacillus sakei* et *Lactobacillus plantarum*), ni de nitrate réductase et de produire des quantités importantes d'acide lactique par fermentation des glucides (Desmazeaud, 1983; Vandamme *et al.*, 1996).

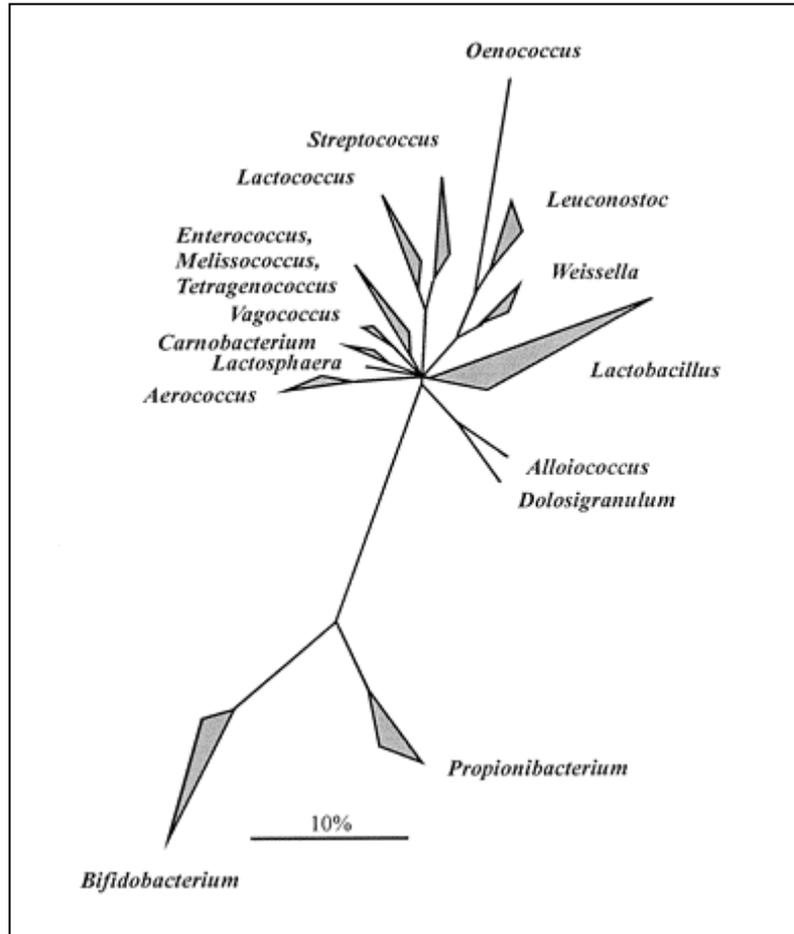
Les glucides peuvent être à l'origine de produits autres que le lactate (Desmazeaud, 1983). Trois catégories des bactéries lactiques peuvent être distinguées selon leurs produits de fermentation. Le groupe homofermentaire qui produit majoritairement de l'acide lactique (90% des produits de fermentation), le groupe hétérofermentaire facultatif qui produit de l'acide lactique ou de l'acide lactique et de l'acide acétique et enfin le groupe hétérofermentaire strict qui produit de l'acide lactique, acétique ou de l'éthanol et du CO<sub>2</sub> (Vandamme *et al.*, 1996).

La plupart des BL sont auxotrophes pour plusieurs acides aminés qu'elles doivent trouver dans le lait (Braquart et Lorient, 1977; Deguchi et Morishita, 1992; Morishita *et al.*, 1981; Neviani *et al.*, 1995).

## 1.2. Classification et taxonomie

En 1997, Stiles et Holzappel ont distingué quatre groupes phylogénétiques principaux au sein des bactéries lactiques (Figure 1) :

- ❖ Le premier groupe est constitué des genres *Streptococcus* et *Lactococcus*. Dans le genre *Streptococcus* une seule espèce (*St. thermophilus*) est utilisée comme ferment dans l'industrie alimentaire.
- ❖ Le deuxième groupe est composé des genres *Oenococcus*, *Leuconostoc* et *Weissella* (Collins *et al.*, 1993). Ces bactéries sont très utilisées dans l'industrie agroalimentaire pour la production de vin (*Oenococcus oeni*), la fermentation de certains légumes (*Leuconostoc citreum*) et la production de choucroute et de dextrane (*Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides*).



**Figure 1: Distances phylogénétiques entre les principaux genres constituant les BL basées sur les séquences des ARNr 16S. Adapté de Schleifer et Ludwig, 1995 (Stiles et Holzapfel, 1997)**

La barre indique une divergence de séquence estimée de 10%. Les bactéries à bas G + C (en haut) sont phylogénétiquement éloignées des bactéries à haut G + C (en bas).

- ❖ Le troisième groupe est celui des *Enterococcus*. Il comporte les genres *Enterococcus*, *Tetragenococcus*, *Melissococcus*, *Carnobacterium*, *Vagococcus*, *Aerococcus* et *Lactosphaera*. Certains de ces genres sont utilisés dans l'industrie agro-alimentaire, par exemple *Carnobacterium piscicola* pour ses éventuelles capacités à inhiber la flore d'altération lors de la fabrication du saumon fumé.
- ❖ Le quatrième groupe phylogénétique comporte deux genres *Lactobacillus* et *Pediococcus*. Selon des études phylogénétiques basées sur les ARN 16S, 5 sous-groupes ont été identifiés au sein du genre *Lactobacillus* : *Lb. acidophilus*, *Lb. salivarius*, *Lb. reuteri*, *Lb. buchneri* et *Lb. plantarum* (Schleifer *et al.*, 1995). De plus, la classification basée sur les

profils fermentaires ne se croise pas systématiquement avec ces différents sous-groupes. Ainsi, ce type de classification ne distingue pas entre les deux genres *Pediococcus* et *Lactobacillus* donc le genre *Pediococcus* est compris dans le groupe *Lactobacillus* (Collins *et al.*, 1991).

La plupart de ces bactéries ont des génomes à bas pourcentage en G + C. Trois autres genres *Bifidobacterium*, *Brevibacterium* et *Propionibacterium* ont été ajoutés au groupe de BL en raison de leur utilisation dans le domaine alimentaire. Cet ajout renforce l'hétérogénéité existante au sein du groupe des BL, notamment parce que le génome de ces trois genres contient un haut pourcentage en bases G et C (Holzapfel *et al.*, 2001; Vandamme *et al.*, 1996).

## 2. Les Streptocoques

Le genre *Streptococcus* comporte majoritairement des espèces bactériennes pathogènes. Des études phylogénétiques basées sur l'analyse de la séquence ARN 16S ont distingué au sein du genre *Streptococcus* 6 groupes : *mutans*, *anginosus*, *pyogenes*, *mitis*, *bovis* et *salivarius* comportant 34 espèces différentes (Kawamura *et al.*, 1995).

De plus, selon le système de Lancefield, 6 groupes (A, B, C, F, G et D) ont été identifiés au sein des streptocoques. Ce système est basé sur les différences immunologiques des polysaccharides de la paroi cellulaire (groupes A, B, C, F et G) ou des acides lipotechoïques (groupe D). Enfin, ces bactéries du genre *Streptococcus*, notamment celles des groupes A et B peuvent provoquer une variété de maladies (Tableau 1) (Cunningham, 2000).

### 2.1. Positionnement de *St. thermophilus* chez les streptocoques

*St. thermophilus* est une bactérie anaérobie aérotoleante, dont la température optimale de croissance se situe entre 37°C et 42°C. Elle appartient au groupe des bactéries Gram+ à bas G + C (39%) (Bolotin *et al.*, 2004). Elle est homofermentaire, c'est-à-dire qu'elle produit majoritairement de l'acide lactique à partir du lactose. Elle est très largement utilisée dans la fabrication de produits laitiers fermentés, de fromages à pâte pressée cuite (Emmental, Gruyère), à pâte pressée (Cheddar) ou à pâte filée (Mozzarella) (Roissart et Luquet, 1994). L'espèce *St. thermophilus* est une des seules du genre *Streptococcus* à ne pas être pathogène et est généralement reconnue comme une espèce bactérienne bénéfique pour la santé du

consommateur (GRAS pour Generally Recognised As Safe). La séquence complète du génome de trois souches de *St. thermophilus* et leur analyse ont confirmé l'absence ou l'inactivation des gènes nécessaires à la virulence chez les streptocoques pathogènes (Bolotin *et al.*, 2004; Makarova *et al.*, 2006).

**Tableau 1 : Exemples de maladies causées par les Streptocoques pathogènes (Cunningham, 2000)**

<b>Streptocoques</b>	<b>Maladies associées</b>
Groupe A : <i>St. pyogenes</i> , <i>St. dysgalactiae</i> spp. <i>equisimilis</i> <i>St. anginosus</i>	Angines et complications. Otites, pneumonies, sinusites. Infections cutanées. Endocardites aiguës. Septicémies. Syndrome de la Tourette.
Groupe B : <i>St. agalactiae</i>	Infections urinaires. Méningites néonatales. Septicémies. Contaminations vaginales.
Groupe C et G : <i>St. dysgalactiae</i>	Infections aiguës de la peau. Infections des voies respiratoires. Endocardites. Infections néonatales.
Groupe D : <i>St. bovis</i> , <i>St. equinus</i> , <i>St. alactolyticus</i> , <i>St. faecalis</i>	Endocardites. Septicémies.
Streptocoques oraux : <i>St. mitis</i> , <i>St. sanguis</i> , <i>St. salivarius</i> , <i>St. pneumoniae</i>	Pathologies dentaires. Endocardites chroniques. Suppurations diverses. Pneumonies. Infections ORL (otites, mastoïdites, sinusites)

Bien que ne colonisant pas la cavité buccale, *St. thermophilus* appartient au groupe des streptocoques oraux qui se compose de 4 sous-groupes : *anginosus*, *mitis*, *mutans* et *salivarius* (Whiley et Beighton, 1998). La comparaison des séquences nucléotidiques des ARNr 16S et des gènes *sodA* a révélé que les espèces du sous-groupe *salivarius*, soit *St. thermophilus*, *St. vestibularis* et *St. salivarius* sont phylogénétiquement très proches (Kawamura *et al.*, 1995). Enfin, le séquençage de plusieurs loci chez différentes souches de ces 3 espèces a confirmé la pertinence du classement de *St. thermophilus* dans le sous-groupe *salivarius* ainsi que son statut d'espèce distincte (Hols *et al.*, 2005).

## **2.2. Caractéristiques du génome de *St. thermophilus***

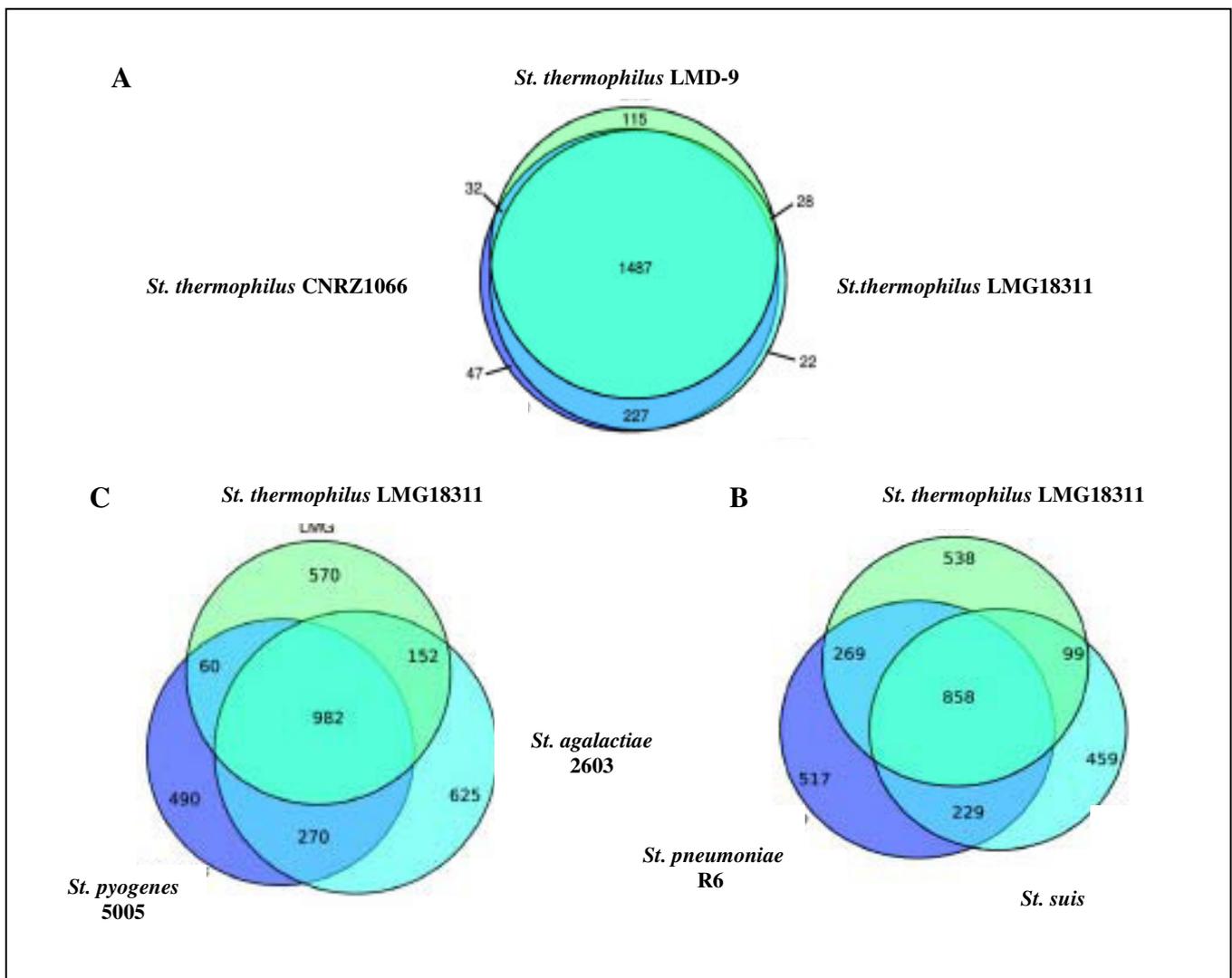
A l'heure actuelle, la séquence du génome de trois souches de *St. thermophilus* isolées du yaourt (CNRZ1066 et LMG18311) ou du fromage (LMD-9), est disponible dans les banques de données EMBL/GenBank (Bolotin *et al.*, 2004; Makarova *et al.*, 2006). La taille du génome de ces trois souches est comprise entre 1,8 Mb et 1,86 Mb avec un faible pourcentage en base G + C (39%). Par ailleurs, la souche LMD-9 héberge des plasmides qui sont en faible nombre de copies (un à deux) (Makarova *et al.*, 2006). Il a d'ailleurs été observé que les souches de *St. thermophilus* possèdent peu de plasmides et que lorsque ceux-ci sont présents, ils sont en faible nombre de copies (Janzen *et al.*, 1992).

La comparaison du génome entièrement séquencé des trois souches de *St. thermophilus* a révélé que 1487 séquences codantes sont homologues entre elles, soit 85% de leur génome (Figure 2A) (Lefébure et Stanhope, 2007).

Par définition, les gènes présents chez l'ensemble des souches testées construisent le cœur de leur génome dont la taille dépend du nombre des souches étudiées. Il a d'ailleurs été observé dans une étude faite sur 47 souches de *St. thermophilus* que le cœur de leurs génomes est construit de 1271 gènes, soit seulement 58% de leurs génomes (Rasmussen *et al.*, 2008). Les différences essentielles détectées entre ces souches concernent les gènes impliqués dans la synthèse de bactériocines, les résistances aux phages, les traces de prophages, la biosynthèse d'exopolysaccharides, les pompes d'efflux et d'entrée et le métabolisme des peptides (Bolotin *et al.*, 2004; Deveau *et al.*, 2008; Horvath *et al.*, 2008; Rasmussen *et al.*, 2008).

Récemment, la diversité génétique de 26 souches de *St. thermophilus* isolées à partir de différentes sources laitières et pour une souche supplémentaire isolée du sang humain (d'une personne atteinte de bactériémie) a été déterminée grâce à la technique de MLST, basée sur la

variation de la séquence nucléotidique de 8 gènes de ménage (*ilvC*, *pepO*, *pyrE*, *glcK*, *ddlA*, *thrS*, *dnaE* et *tkl*). Il a été démontré une très faible divergence des séquences entre les souches de *St. thermophilus* (en moyenne 0,2%), ce qui suggère que cette espèce représente une population qui a émergé récemment (Delorme *et al.*, 2010).



**Figure 2 : Représentation schématique de l'analyse comparative des génomes entièrement séquencés de *Streptococcus* (Lefébure et Stanhope, 2007)**

(A) Répartition des gènes pour les 3 génomes de *St. thermophilus* (LMD-9, CNRZ1066 et LMG18311). (B) Répartition des gènes pour les 3 génomes de *St. thermophilus* LMG18311, *St. pneumoniae* R6 et *St. suis*. (C) Répartition des gènes pour les 3 génomes de *St. thermophilus* LMG18311, *St. pyogenes* MGAS5005 et *St. agalactiae* 2603V/R.

De la même façon, une étude faite sur 27 souches de *St. salivarius* et 9 souches de *St. vestibularis* isolées à partir de la cavité orale et du sang humain suggère que des échanges génétiques fréquents entre ces deux espèces (*St. salivarius* et *St. vestibularis*) ont lieu (Delorme *et al.*, 2006). En comparaison avec *St. thermophilus*, la divergence de séquences intra-espèces, c'est-à-dire entre les souches de *St. salivarius* ou entre celles de *St. vestibularis*, est plus importante (5,8% et 2%, respectivement) (Delorme *et al.*, 2006).

Un lien entre une faible divergence de séquence et une récente émergence de l'espèce bactérienne a été déjà décrit chez les génomes des bactéries pathogènes comme *St. agalactiae* (Brochet *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2003; Luan *et al.*, 2005; Tettelin *et al.*, 2002).

La comparaison du génome de *St. thermophilus* LMG18311 avec ceux de quatre espèces pathogènes complètement séquencés du genre *Streptococcus* (*St. pyogenes*, *St. pneumoniae*, *St. suis* et *St. agalactiae*) a confirmé la proximité génétique existant entre les différentes espèces de streptocoques (Figures 2B et 2C). En effet, plus de 54% des gènes de *St. thermophilus* sont orthologues à des gènes des streptocoques pathogènes, partageant ainsi une partie importante de leur métabolisme et physiologie (Figures 2B et 2C) (Hols *et al.*, 2005).

### **2.3. Adaptation de *St. thermophilus* dans sa niche écologique (le lait)**

L'acquisition et la perte des gènes ont contribué chez les bactéries à l'élaboration de leur génome (Lawrence, 1999). Dans le cas de *St. thermophilus*, bien que l'acquisition d'un grand nombre de nouvelles fonctions puisse être le facteur clé d'adaptation de ces bactéries à sa niche écologique, la perte des gènes reste une empreinte importante dans l'évolution du génome de cette bactérie (Bolotin *et al.*, 2004).

#### **2.3.1. L'évolution du génome de *St. thermophilus***

Le génome de *St. thermophilus* a évolué par inactivation de gènes apparaissant sous forme de pseudogènes. Le taux de pseudogènes a été estimé à 10,4% de la totalité des séquences codantes du génome de *St. thermophilus*, contre seulement 4,2%, 0,7% et 1,6% pour *St. pneumoniae*, *St. pyogenes* et *St. agalactiae* respectivement. Ce taux élevé de pseudogènes chez *St. thermophilus* résulte de mutations telles que des décalages du cadre de lecture, des mutations non-sens, des recodages ou encore des délétions lors des réarrangements génomiques (Bolotin *et al.*, 2004).

### 2.3.1.1. Perte des fonctions pendant l'évolution de *St. thermophilus*

L'analyse du génome des souches LMG18311 et CNRZ1066 de *St. thermophilus* a révélé que la présence de pseudogènes varie en fonction des voies métaboliques (Tableau 2). En effet, le taux de pseudogènes retrouvés dans des fonctions essentielles à la cellule bactérienne, par exemple, la transcription et la traduction est de 0 et 3,5%, respectivement. En revanche, un tiers des gènes dédiés à l'absorption et à la dégradation des glucides sont des pseudogènes, affectant tout particulièrement les gènes codant les transporteurs de type PTS (phosphotransférase système) (Bolotin *et al.*, 2004). C'est le cas des gènes *ptsG*, *fruA*, *bglP* et *treP* qui codent respectivement les systèmes PTS du glucose, du fructose, du  $\beta$ -glucoside et du tréhalose. Ces gènes sont tous des pseudogènes chez 8 souches analysées de *St. thermophilus* (sauf un cas exceptionnel : le gène *fruA* serait actif chez une seule souche) alors que ces gènes sembleraient tous actifs chez les 4 souches analysées de *St. salivarius* (Bolotin *et al.*, 2004). La majorité des souches de *St. thermophilus* est incapable également de métaboliser le galactose, même si une partie de ces souches possède l'ensemble des gènes (*galKTEM*) nécessaires à cette utilisation (Van den Bogaard *et al.*, 2004). Donc la déficience dans le métabolisme du galactose ne vient pas de l'absence d'un gène mais plutôt d'une faible activité de l'enzyme galactokinase codée par le gène *galK*, qui est nécessaire pour initier la dégradation du galactose (Vaillancourt *et al.*, 2004; Vaughan *et al.*, 2001).

Par contre, *St. thermophilus* contrairement aux autres streptocoques, possède un transporteur de lactose, source de carbone du lait (Bolotin *et al.*, 2004). Donc, *St. thermophilus* s'est spécialisé uniquement dans la dégradation du lactose (Bolotin *et al.*, 2004). Cependant, cette spécialisation ne permet pas à *St. thermophilus* de coloniser de nouvelles niches écologiques, contrairement aux streptocoques pathogènes qui révèlent une haute flexibilité d'utilisation des glucides surtout des polymères glucidiques complexes comme l'amidon et le glucane. Ainsi des enzymes spécifiques, comme la dextranase et la mutanase produites chez les streptocoques oraux (*St. mutans* et *St. salivarius*), sont impliquées dans la synthèse et la structure (voire composition) du glucane contenu dans la plaque dentaire (Hayacibara *et al.*, 2004; Lawman et Bleiweis, 1991). Pour conclure, la question qui se pose est la suivante : *St. thermophilus* est-il condamné à occuper une seule niche écologique ?

**Tableau 2 : Distribution des pseudogènes dans les différentes fonctions cellulaires de *St. thermophilus* CNRZ1066 et LMG18311 (Bolotin *et al.*, 2004)**

Catégories fonctionnelles	CNRZ1066			LMG18311		
	Total CDS	CDS <sup>1</sup> tronquées		Total CDS	CDS <sup>1</sup> tronquées	
		Nb <sup>2</sup>	%		Nb <sup>2</sup>	%
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	12,0	20	1	5,0
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, nucléotides et nucléosides	72	12	16,7	70	12	17,1
Fonctions de régulations	101	23	22,8	100	23	23,0
Réplication, Métabolisme d'ADN	93	15	16,1	93	13	14,0
Transcription, Métabolisme d'ARN	37	0	0,0	37	0	0,0
Traduction, Métabolisme des protéines	146	5	3,4	144	5	3,5
Protéines de transport et de liaisons	253	76	30,0	246	77	31,3
Autres fonctions (Phage, tranposane..)	147	90	61,2	138	82	59,4
Potentielles fonctions	413	55	13,3	425	71	16,7
Inconnu <sup>3</sup>	185			166		
<b>Total</b>	<b>1,915</b>	<b>352</b>	<b>18,4</b>	<b>1,890</b>	<b>358</b>	<b>18,9</b>

<sup>1</sup>CDS : séquences codantes (Coding DNA sequences)

<sup>2</sup>correspond au nombre de CDSs tronquées et retrouvées dans les génomes de *St. thermophilus*.

<sup>3</sup>fonctions inconnues exclues de cette analyse.

### 2.3.1.2. Perte des gènes liés à la virulence chez *St. thermophilus*

L'établissement de la séquence de 3 génomes de *St. thermophilus* disponible dans les banques de données (LMG18311, CNRZ1066 et LMD-9) a permis de rechercher systématiquement les déterminants génétiques potentiels de virulence (Bolotin *et al.*, 2004; Hols *et al.*, 2005).

Ainsi, plusieurs gènes de virulence connus chez les streptocoques pathogènes sont absents dans le génome de *St. thermophilus*. De plus, les gènes de virulence présents dans le génome de *St. thermophilus* sont soit des pseudogènes, soit des orthologues qui codent des protéines impliquées dans des fonctions cellulaires basiques de cette bactérie (Bolotin *et al.*, 2004). Par exemple, chez *St. pneumoniae* le gène *pbp1B* code une protéine de fixation de la pénicilline alors que chez *St. thermophilus*, il joue un rôle dans la biosynthèse du peptidoglycane (Bolotin *et al.*, 2004; Tettelin *et al.*, 2001). La comparaison du génome de *St. thermophilus* CNRZ1066 avec ceux de *St. pyogenes* M1 et *St. pneumoniae* TIGR4 a révélé que plus de 25%

(25/92) des gènes liés à la virulence présents à la fois dans les génomes de *St. pyogenes* et *St. pneumoniae* étaient absents du génome de *St. thermophilus* et que 40% d'entre eux (9/25) sont retrouvés dans des régions synthéniques entre ces deux génomes. Ainsi, ces gènes seraient présents chez la souche ancestrale à ces trois espèces, et *St. thermophilus* les aurait perdus (Bolotin *et al.*, 2004).

Par ailleurs, les gènes absents sont principalement les gènes qui codent les protéines de surface telles que des protéines de virulence PspA, PspC, des adhésines ou encore des protéases. Cependant, les gènes actifs liés à la virulence chez les streptocoques ne sont pas forcément des gènes de virulence chez *St. thermophilus*. Par exemple, une souche de *St. pneumoniae* dépourvue de capsule (*eps<sup>-</sup>/cps<sup>-</sup>*) n'est plus virulente alors que les gènes *eps* de *St. thermophilus* impliqués dans la synthèse des exopolysaccharides n'ont aucun effet ni sur la croissance ni sur la survie de cette bactérie en lait. Ces exopolysaccharides donnent une texture lisse et crémeuse souvent recherchée pour la fabrication de certains yaourts (Broadbent *et al.*, 2003). De plus, contrairement à certains streptocoques qui possèdent des gènes de résistances aux antibiotiques comme propriété importante de leur pouvoir pathogène, le génome des 3 souches de *St. thermophilus* LMG18311, CNRZ1066 et LMD-9 en est dépourvu (Bolotin *et al.*, 2004; Glaser, 2002; Hols *et al.*, 2005).

Certains facteurs de virulence sont ancrés à la paroi via une sortase. Il existe différents types de sortases (A, B, C et D) qui reconnaissent des motifs d'ancrage différents (Tableau 3). Pour les souches CNRZ1066 et LMG 18311, seul le gène de la sortase A a été retrouvé dans le génome et il est sous forme de pseudogène. De plus, chez ces deux souches, aucune protéine fonctionnelle contenant le motif LPXTG n'a été identifiée (Bolotin *et al.*, 2004). Par contre, chez la souche LMD-9, une protéase de surface fonctionnelle (la protéase PrtS) a été détectée (Galia *et al.*, 2009). C'est une protéine ancrée à la surface de la paroi via un motif LPXTG (Delorme *et al.*, 2010; Fernandez-Espla *et al.*, 2000; Galia *et al.*, 2009). Donc, la souche LMD-9 présente un gène de sortase A fonctionnel et la protéase PrtS pourrait être ancrée par cette sortase. Les streptocoques pathogènes possèdent un nombre élevé des gènes codant pour les sortases et des protéines putatives ancrées à la surface via ces sortases (Tableau 4). Ce nombre élevé, par rapport à celui des souches de *St. thermophilus*, pourrait être lié à la virulence des streptocoques pathogènes. En effet, il a été montré que lorsque les sortases sont mutées chez des streptocoques pathogènes tels que *St. mutans* et *St. gordonii*, les mutants ont une virulence plus faible chez les animaux modèles (Paterson et Mitchell, 2004).

Dans une étude *in silico* faite sur 199 génomes entièrement séquencés, 732 protéines possédant le motif de la sortase (LPXTG) ont été identifiées dans 49 génomes. Le nombre de

ces protéines diffère d'une espèce à l'autre. Par exemple, chez *Lb. plantarum* WCFS1, parmi les protéines qui peuvent se fixer au peptidoglycane, 27 portent un motif LPXTG alors que chez *Lc.lactis* IL1403 12 protéines ont été identifiées (Boekhorst *et al.*, 2005).

Sur 568 protéines identifiées en tant que potentiel substrat de la sortase (possédant le motif LPXTG), 67% n'ont pas de fonction connue, 15% pourraient avoir une fonction enzymatique et 10% pourraient avoir une fonction de liaison (par exemple, la protéine de liaison au collagène) (Boekhorst *et al.*, 2005).

**Tableau 3 : Classification des sortases chez les bactéries à Gram<sup>+</sup> (Comfort et Clubb, 2004; Dramsi *et al.*, 2005)**

Classe de sortase	Site de clivage	Genre bactérien
A	LPKT-Ge	<i>Listeria, Staphylococcus, Enterococcus Streptococcus Bacillus</i>
B	NPqt-nd	<i>Streptococcus, Bacillus, Listeria, Staphylococcus, Clostridia</i>
C	1PKT-GG	<i>Actinobacteria, Bacillus, Enterococcus, Clostridia...</i>
D	LPnT-At, LAeT-Ga	<i>Bacillus, Actinobacteria</i>

### 2.3.2. Intégration de nouvelles fonctions chez *St. thermophilus*

Bien que l'élaboration du génome de *St. thermophilus* se soit construite par l'inactivation et la perte d'un grand nombre de gènes surtout des gènes liés à la virulence, le transfert horizontal a participé à l'acquisition de nouveaux gènes et donc a contribué à son adaptation dans le lait (Bolotin *et al.*, 2004).

Des événements de transfert horizontal ont été observés entre des espèces relativement éloignées phylogénétiquement, mais de proximité écologique étroite, comme *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus*. Ces deux espèces sont utilisées ensemble pour la fabrication de yaourt et elles sont capables d'adhérer l'une sur l'autre ce qui pourrait faciliter le transfert horizontal entre elles (Bolotin *et al.*, 2004; Tamine et Deeth, 1980).

**Tableau 4 : Comparaison des protéines de surface putatives retrouvées sur les génomes des streptocoques (Bolotin *et al.*, 2004)**

	Les gènes de la sortase <sup>1</sup>	Protéines possédant le motif de la sortase <sup>1</sup>	Autres <sup>2</sup>	Lipoprotéines <sup>3</sup>
<b><i>St. thermophilus</i> CNRZ1066</b>				
Gènes complets	0	0	3	27(16) <sup>11</sup>
Pseudogènes <sup>4</sup>	1	1	8	2(2) <sup>11</sup>
<b><i>St. thermophilus</i> LMG18311</b>				
Gènes complets	0	0	5	28(16) <sup>11</sup>
Pseudogènes	1	1	8	2(2) <sup>11</sup>
<b><i>St. pneumoniae</i> TIGR4<sup>5</sup></b>	1-[4 <sup>1</sup> ]	18-[15 <sup>1</sup> ]	19	36(22) <sup>11</sup>
<b><i>St. pyogenes</i> SF370<sup>6</sup></b>	1-[2 <sup>1</sup> ]	12-[15 <sup>1</sup> ]	n.d. <sup>10</sup>	n.d.
<b><i>St. agalactiae</i> 2603V/R<sup>7</sup></b>	n.d.-[6 <sup>1</sup> ]	24-[23 <sup>1</sup> ]	n.d.	43
<b><i>St. agalactiae</i> NEM316<sup>8</sup></b>	5	30-[35 <sup>1</sup> ]	n.d.	36(20) <sup>11</sup>
<b><i>St. mutans</i> UA159<sup>9</sup></b>	1	6	5 <sup>12</sup>	27-35(15) <sup>11</sup>

<sup>1</sup>L'identification des gènes de la sortase dans le génome de *St. thermophilus* est basée sur les données présentes dans le travail de Comfort et Clubb, 2004. Le motif de la sortase recherché dans le génome de *St. thermophilus* est le motif identifié par (Janulczyk et Rasmussen, 2001). Le nombre récemment attribué ([X]) des gènes de la sortase et des protéines avec le motif de cette dernière dans les streptocoques pathogènes est recherché dans le travail de Comfort et Clubb, 2004. <sup>2</sup>Les protéines (putatives) de la surface cellulaire identifiées dans le génome de *St. thermophilus* par identité avec celles trouvées chez les autres bactéries à Gram<sup>+</sup>. <sup>3</sup>Les lipoprotéines putatives identifiées par le motif prosite PS00013 (PS51257) et le motif G+LPP (Sutcliffe et Harrington, 2002).

<sup>4</sup>Inactivation des gènes par un ou plusieurs décalages du cadre de lecture, par la présence d'un codon stop ou par une extrémité 3' tronquée.

Les références des données utilisées sont (Tettelin *et al.*, 2001<sup>5</sup>, 2002<sup>6</sup>; Glaser *et al.*, 2002<sup>7</sup>; Ajdić *et al.*, 2002<sup>8</sup>; Ochman *et al.*, 1999<sup>9</sup>).

<sup>10</sup>n.d., non déterminé. <sup>11</sup>Protéines affines aux substrats de type ABC. <sup>12</sup>Ce nombre correspond seulement aux protéines affines au glucane avec une répétition (A) en tandem.

Enfin, 16% des gènes de *St. thermophilus* auraient été acquis par transfert horizontal, soit 226 gènes dont 47 sont des pseudogènes (Hols *et al.*, 2005). Cette observation semble contredire l'idée que l'acquisition des gènes est contrôlée par la sélection des fonctions apportant un avantage pour la survie ou la capacité de croissance. Cependant, la présence de certains pseudogènes à côté des gènes importants pour la cellule pourrait expliquer leur acquisition dans le génome (Hols *et al.*, 2005).

### 2.3.2.1. Des éléments génétiques contribuant à l'élaboration du génome de *St. thermophilus*

Les éléments mobiles jouent un double rôle d'une part dans l'acquisition de nouveaux gènes via les événements de transfert horizontal et de l'autre part dans le réarrangement du génome.

Les séquences d'insertion (IS) font partie des éléments mobiles qui pourraient provoquer l'activation d'un gène par exemple par insertion d'un promoteur, ou son inactivation du fait d'inversions, délétions ou intégrations (Galas et Chandler, 1989; Guédon *et al.*, 1995).

Plus de 50 IS ont été trouvées dans le génome de deux souches de *St. thermophilus* (CNRZ1066 et LMG18311). Certaines d'entre elles possèdent un pourcentage en G + C différent du reste du génome et sont associées aux gènes liés à l'adaptation à la croissance dans le lait (Bolotin *et al.*, 2004).

Les IS1191 et IS981 ont été les premières découvertes chez *St. thermophilus* (Guédon *et al.*, 1995). IS1191 est présente chez les 25 souches de *St. thermophilus* testées au cours de l'étude, mais seulement chez une seule souche de *Lc. lactis* ssp. *lactis* et de *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Les auteurs en ont donc conclu que cette séquence est indigène chez *St. thermophilus* et qu'il existe bien des transferts d'IS entre bactéries de genres différents. Ces transferts auraient eu lieu au cours de leur association pendant la fabrication des fromages, de yaourts ou d'autres produits laitiers.

Par contre, l'ensemble des souches testées de *Lc. lactis* ssp. *lactis* possède l'IS981 à raison de 4 à 26 copies par souche et seulement les souches de *St. thermophilus* isolées de fromages en possèdent mais avec un nombre de copies moins important (1 à 6 copies par souche). Une seule souche utilisée dans la fabrication du yaourt possède cette séquence d'insertion. Les auteurs en ont donc conclu que leur présence chez *St. thermophilus* résulte de leur transfert de *Lc. lactis* vers *St. thermophilus*, ce qui est corrélé au fait que chez les souches de *St. thermophilus* issues du yaourt la présence de cette IS est rare et les IS981 des deux espèces gardent des fortes homologies entre-elles (Guédon *et al.*, 1995). Le transfert d'IS de *Lc. lactis* ssp. *lactis* vers *St. thermophilus* a été également observé dans le cas de l'ISS1, trouvée chez les deux espèces (Bourgoin *et al.*, 1996).

D'autres éléments mobiles (ICESt1, ICESt3, pour Integrative Conjugative Elements) ont été identifiés chez *St. thermophilus*. Il s'agit des éléments intégratifs conjugatifs spécifiques de *St. thermophilus* et ils sont capables de s'exciser et de s'intégrer par recombinaison site spécifique de côté 3' du gène *fda* codant la fructose-1,6-diphosphate aldolase (Pavlovic *et al.*, 2004). Ces éléments se transfèreraient par conjugaison vers d'autres bactéries lactiques, notamment les bactéries pouvant être utilisées en co-culture avec *St. thermophilus* telle que *Lc. lactis* (Bellanger *et al.*, 2009).

#### 2.3.2.2. Acquisition de nouveaux gènes par transfert horizontal

Une étude récente a démontré un transfert horizontal d'une fonction métabolique importante d'une espèce commensale et/ou pathogène à *St. thermophilus*. Il s'agit d'un îlot génomique de 15 kb localisé entre le pseudogène *ciaH* et le gène *rpsT*. Cet îlot contient quatre gènes *potC*

(tronqué), *potD*, *eriC* et *priS* et il est entouré par deux éléments mobiles de type IS, le premier étant une transposase appartenant à la famille IS3 et le deuxième, un ISS*thI* appartenant à la famille ISL3. Ces quatre gènes présentent une forte identité avec l'ADN génomique de *St. suis* et gardent la même synténie chez les deux espèces. Ceci suggère que cet îlot a été acquis par transfert horizontal d'un streptocoque proche de *St. suis* (Delorme *et al.*, 2010). Bien que cet îlot ne possède aucun élément de transfert, *St. thermophilus* pourrait l'accueillir grâce à sa capacité à développer une compétence naturelle (Blomqvist *et al.*, 2006). Ainsi, grâce à cet îlot génomique, *St. thermophilus* a acquis le gène *priS* qui peut être le facteur clé d'adaptation de cette bactérie à sa niche écologique, le lait. Ce cas donne l'exemple d'un échange de gènes entre espèces phylogénétiquement proches mais de proximité écologique éloignée puisque ces bactéries ne partagent pas la même niche écologique. *St. suis* est un pathogène retrouvé chez le porc, qui peut être transmis à l'homme lors de contact avec des porcs malades (Lun *et al.*, 2007).

Un deuxième exemple d'acquisition de gènes par transfert horizontal, est l'îlot génomique de 17 kb localisé au sein du gène *pepD* (gène tronqué codant pour une endopeptidase). Grâce à cet îlot génomique, *St. thermophilus* a acquis notamment le gène *metC* impliqué dans la biosynthèse de la méthionine chez *Lb. bulgaricus* (Bolotin *et al.*, 2004), acide aminé rare dans le lait et nécessaire à la croissance de *St. thermophilus* (Tamine et Deeth, 1980).

### **3. Le métabolisme azoté chez *St. thermophilus***

#### **3.1. Exigences en acides aminés**

Chez les BL en général et *St. thermophilus* en particulier, les exigences en acides aminés sont très variables suivant les souches. Par exemple, alors que les 9 gènes utiles à la biosynthèse de l'histidine sont présents dans le génome de *St. thermophilus* LMD9, les génomes de *St. thermophilus* CNRZ1066 et LMG18311 n'en possèdent qu'un, le gène *hisK* (Hols *et al.*, 2005). Les gènes *dapE*, *alaD* et *yhcE* nécessaires pour la biosynthèse de la lysine, l'alanine et des acides aminés soufrés sont tronqués chez *St. thermophilus* CNRZ1066 et LMG18311, ce qui implique probablement que ces deux souches ne peuvent pas les synthétiser (Hols *et al.*, 2005). De plus, le gène *yhcE* est tronqué chez la souche LMD-9 ce qu'il peut expliquer son auxotrophie pour au moins un des deux acides aminés soufrés (Hols *et al.*, 2005).

De nombreuses souches sont capables de croître avec un mélange de glutamine, de méthionine, de leucine et d'histidine comme seule source d'acides aminés. Si dans le milieu

MCD (Milieu Chimiquement Défini), il y a ni glutamate ni glutamine, ou alors ni cystéine ni méthionine la croissance de *St. thermophilus* est complètement abolie, indiquant que ces voies de synthèses ne sont pas complètement fonctionnelles (Letort et Juillard, 2001). De plus, des acides aminés non essentiels à la croissance mais qui permettent de la stimuler ont été répertoriés. Il s'agit de la leucine, la valine, la méthionine, et la cystéine (Garault *et al.*, 2000; Monnet *et al.*, 2003).

Il est intéressant de noter que les besoins en acides aminés pourraient résulter de l'absence ou même de l'inactivation de gènes impliqués dans leur voie de biosynthèse mais aussi de mécanismes de régulations spécifiques (Bracquart et Lorient, 1979; Garault *et al.*, 2000).

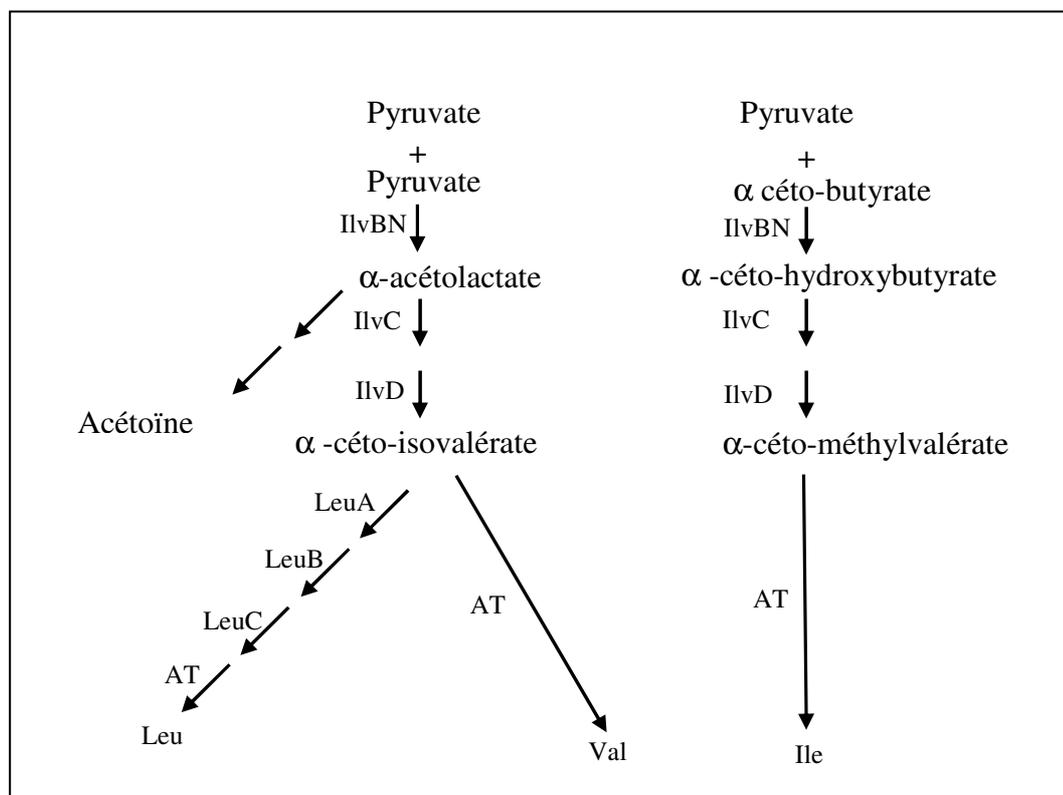
Dans la suite de cette introduction, la biosynthèse des acides aminés branchés sera plus particulièrement détaillée en raison de leur implication dans la régulation du métabolisme azoté. En effet chez les bactéries modèles *Lc. lactis* et *B. subtilis* et chez certains streptocoques pathogènes comme *St. pneumoniae* et *St. gordonii*, la régulation des gènes impliqués dans le métabolisme azoté a été relativement bien décrite et les acides aminés branchés sont impliqués directement dans cette régulation.

- Biosynthèse des acides aminés à chaîne ramifiée (BCAA) chez *St. thermophilus*

Contrairement aux souches de *Lc. lactis* d'origine laitière, *St. thermophilus* possède des voies de biosynthèse des BCAA fonctionnelles et essentielles à la croissance en lait (Garault *et al.*, 2000; Godon *et al.*, 1992, 1993). Ces acides aminés à chaîne ramifiés (isoleucine, leucine et valine) sont essentiels pour la croissance en lait et ils jouent un rôle potentiel dans la régulation du système protéolytique. Dans un premier temps, trois enzymes communes (IlvB/N, IlvC et IlvD) sont impliquées dans la voie de biosynthèse de ces trois acides aminés puis des enzymes spécifiques interviennent pour chacun d'entre eux (Figure 3). Des expériences portant sur 13 souches industrielles de *St. thermophilus* ont montré que la voie de biosynthèse des BCAA est active et indiquent que ce caractère semble répandu dans cette espèce (Garault *et al.*, 2000). Les avantages possibles de maintenir cette voie active chez *St. thermophilus* peuvent être liés à son adaptation au lait où la quantité assimilable des BCAA ne suffit pas à une croissance optimale de cette bactérie. Elle serait aussi impliquée dans la tolérance à l'acide par le maintien du pH interne comme cela a été prouvé chez *St. mutans* (Garault *et al.*, 2000; Len *et al.*, 2004). Garault *et al.* (2000) ont démontré que le gène *ilvC* codant pour une céto-acide réducto-isomérase est transcrit indépendamment des 2 autres gènes (*ilvB/N* et *ilvD*). La synthèse de l'acétolactate est réalisée par l'acétolactate synthase (IlvB/N) à partir du pyruvate. L'acétolactate, substrat de l'enzyme céto-acide

réducto-isomérase (IlvC), est un intermédiaire dans la formation de l'acétoïne d'une part et dans la synthèse de la leucine et de la valine d'autre part (Figure 3).

La transcription indépendante du gène *ilvC* chez *St. thermophilus* permettrait d'éviter l'accumulation de l'acétolactate, éventuellement toxique. De plus, la synthèse de l'acétoïne intervient dans la conservation du pH intracellulaire des bactéries, en transformant les métabolites acides en composés neutres et contribue aussi à la régénération du NAD<sup>+</sup> (Renna *et al.*, 1993; Tsau *et al.*, 1992).



**Figure 3 : Voie de biosynthèse des acides aminés à chaîne ramifiée (BCAA) (Garault *et al.*, 2000)**

IlvBN : acétolactate synthase, IlvC : céto-acide réducto-isomérase, IlvD : acide dihydroxy déshydratase, AT : Aminotransférase des acides aminés à chaîne ramifiée, LeuA : isopropyl malate synthase, LeuB : isopropyl malate deshydrogénase, LeuC : isopropyl malate deshydrogénase.

La biosynthèse des BCAA chez *St. thermophilus* est probablement inhibée par des produits finaux. Bracquart *et al.*, (1979) ont remarqué de puissants effets antagonistes entre les trois acides aminés à chaîne ramifiée sur la croissance de *St. thermophilus* CNRZ302. Alors que la croissance n'était pas possible en absence de valine, elle était possible en absence de ces trois

acides aminés à chaîne ramifiée. L'ajout d'isoleucine, et dans une moindre mesure de leucine, entraîne une forte inhibition de la biosynthèse de la valine. De plus dans une autre étude, avec la souche St18, l'ajout d'isoleucine et/ou de leucine dans le milieu comme seul(s) acide(s) aminé(s) branché(s) diminue le taux de croissance de cette souche (Garault *et al.*, 2000).

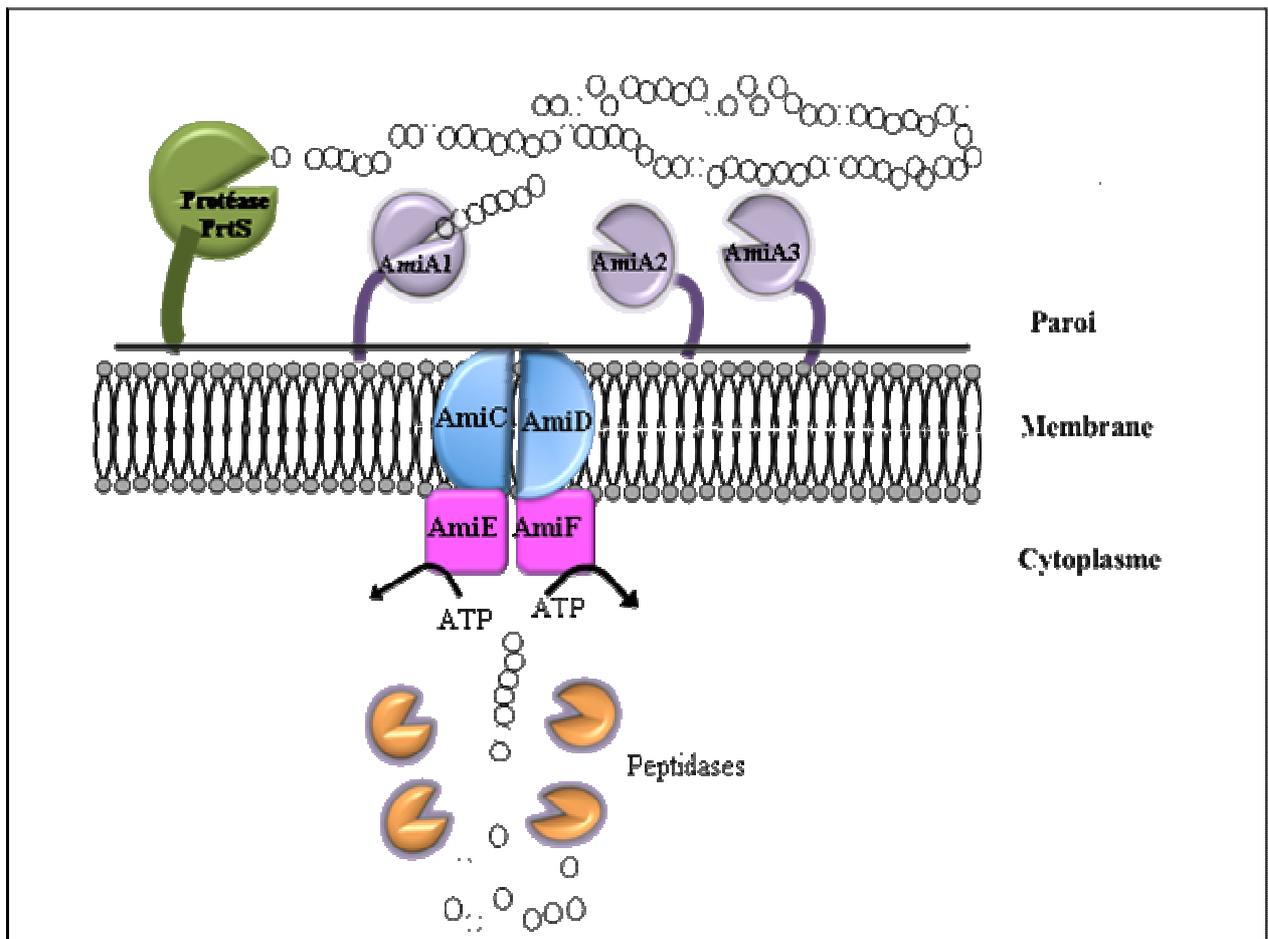
Concernant des autres streptocoques, la voie de biosynthèse des BCAA est absente chez *St. pyogenes* (Ferretti *et al.*, 2001), ce qui rend cette bactérie absolument dépendante des systèmes de transport des oligopeptides et des BCAA. Quant à *St. pneumoniae*, il possède l'ensemble des gènes codant pour la synthèse des BCAA avec l'opéron *ilvBNC*, mais il est aussi capable de capter ces acides aminés dans l'environnement *via* la perméase codée par l'opéron *livJHMGF* (Lanie *et al.*, 2007).

### **3.2. Système protéolytique**

*St. thermophilus* dispose d'un système protéolytique similaire à celui retrouvé chez d'autres bactéries lactiques (Figure 4). Il est constitué i) d'une protéase ancrée à la paroi capable de dégrader les lactoprotéines, ii) de systèmes de transport pour des peptides et des acides aminés, iii) d'un pool de peptidases intracellulaires indispensables à la dégradation des peptides internalisés (Hols *et al.*, 2005; Monnet, 2006).

#### **3.2.1. Protéase de paroi**

Chez de nombreuses BL utilisées en industrie laitière, une protéase de paroi est retrouvée. Cette protéase permet à ces différentes espèces d'hydrolyser les lactoprotéines et de se développer dans le lait. Certaines souches de BL ne possèdent pas de protéase de paroi et se développent mal ou dépendent de la protéase de paroi présente chez l'autre espèce qui se développe en symbiose dans le lait (Savijoki *et al.*, 2006). Cinq types de protéases de paroi présentant certaines différences ont été identifiées chez les BL : PrtP chez *Lactobacillus paracasei* et *Lc. lactis*, PrtH chez *Lb. helveticus*, PrtR chez *Lactobacillus rhamnosus*, PrtB chez *Lb. bulgaricus* et PrtS chez *St. thermophilus* (Figure 5) (Savijoki *et al.*, 2006; Siezen, 1999). Ces CEPs sont synthétisées sous forme de préprotéine d'environ 2000 résidus et sont constituées de plusieurs domaines fonctionnels distincts (Fernandez-Espla *et al.*, 2000; Siezen, 1999). Elles appartiennent à la même famille appelée "subtilisin" de part l'homologie du domaine catalytique entre ces protéases et la subtilisine de *B. subtilis* (Siezen et Leunissen, 1997).

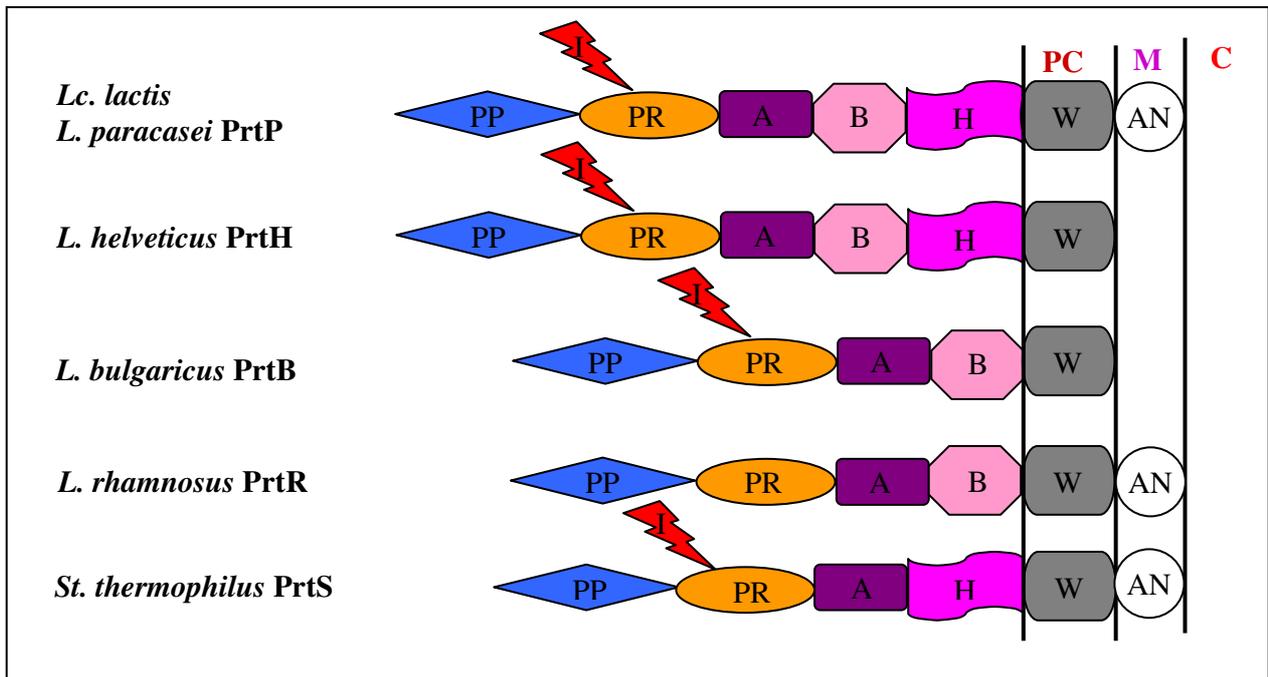


**Figure 4 : Représentation schématique du système protéolytique de *St. thermophilus* (D'après Monnet 2006)**

Protéase de paroi : PrtS présente chez certaines souches

Système de transport d'oligopeptides AmiACDEF : AmiA1, A2, A3 protéines affines aux oligopeptides ; AmiC et D perméases, AmiE et F ATPases

Peptidases intracellulaires

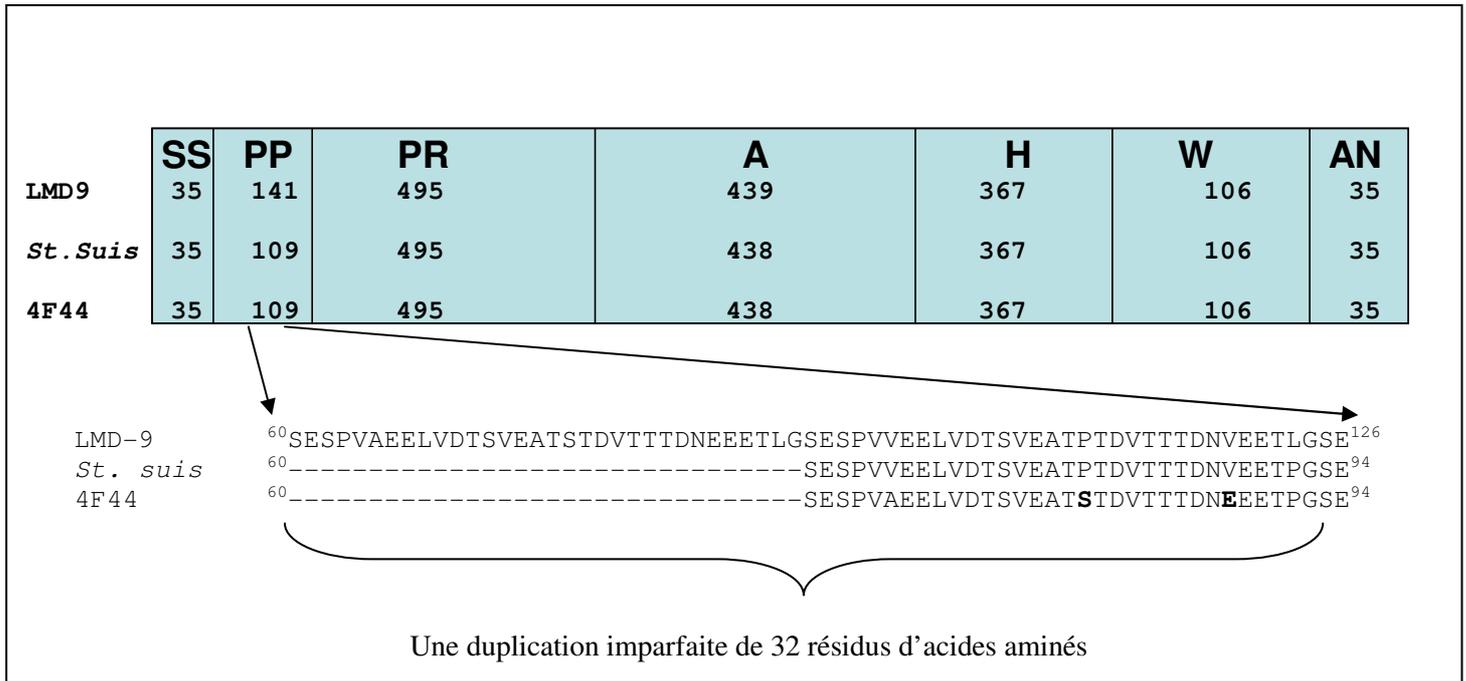


**Figure 5 : Représentation schématique des différents domaines composants les protéases de parois, selon (Fernandez-Espla *et al.*, 2000; Savijoki *et al.*, 2006; Siezen, 1999)**

Abréviations : CW, paroi cellulaire ; M, membrane cellulaire ; C, cytoplasme ; PP, préprodomeine ; PR, domaine catalytique ; I, domaine d'insertion ; A, domaine globulaire ; B, domaine B ; H, domaine hélicoïdal ; W, domaine espaceur ; AN, domaine d'ancrage.

- Caractérisation de PrtS

Le gène *prtS* a été séquencé chez la souche CNRZ385 (Fernandez-Espla *et al.*, 2000). La taille de ce gène est de 4755 pb et code une protéine de 1585 résidus d'acides aminés, soit une masse moléculaire théorique de 169 kDa. Une séquence RBS (Ribosome Binding Site) est localisée à 5 pb en amont du codon start (ATG). Par contre, le ou les promoteur(s) n'ont pas été formellement identifiés car aucune séquence consensus caractéristique des promoteurs de *St. thermophilus* n'a été détectée en amont du codon ATG. La protéase PrtS comporte plusieurs domaines (Figure 6) (Fernandez-Espla *et al.*, 2000; Galia *et al.*, 2009).



**Figure 6 : Représentation schématique des domaines composants la protéase PrtS de *St. thermophilus* LMD-9, 4F44 et *St. suis***

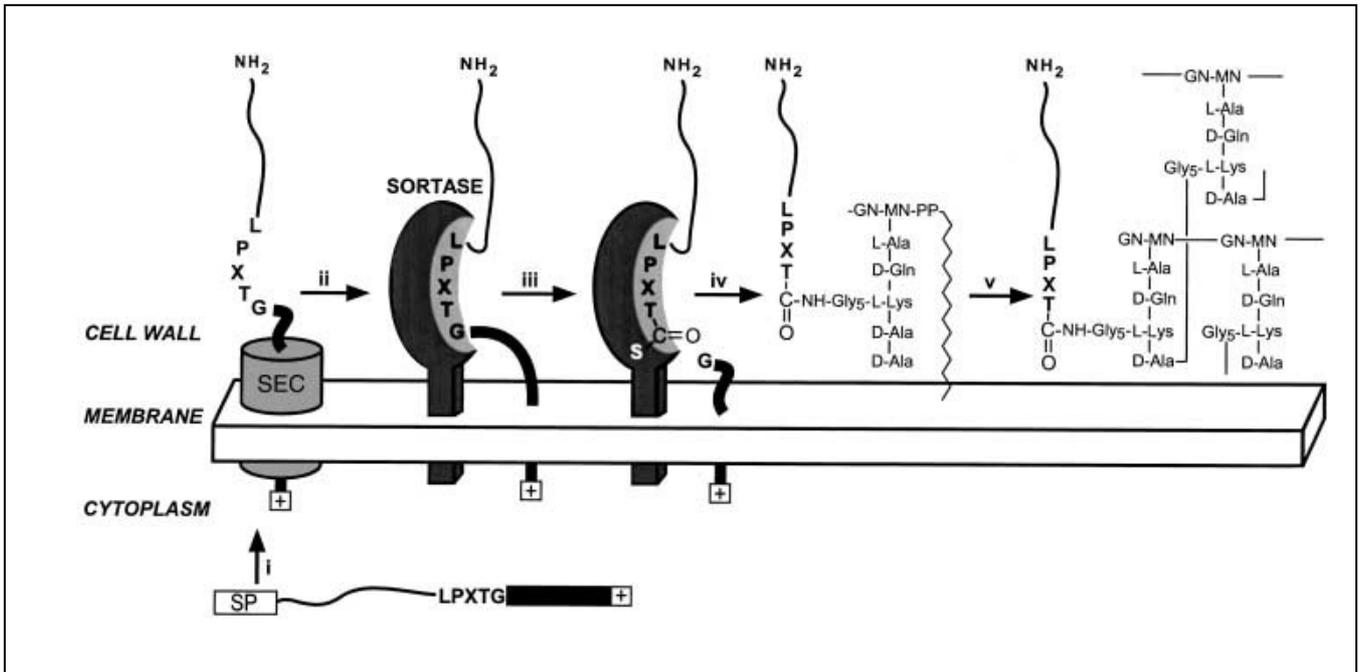
Structure en domaine de la protéase PrtS de *St. thermophilus* LMD-9 (numéro d'accèsion YP 820283) et comparaison avec celle de *St. thermophilus* 4F44 (numéro d'accèsion, AAG09771) et celle de *St. suis* (numéro d'accèsion ZP 00875908), avec une représentation de la duplication de 32 résidus d'acides aminés détectée chez la souche LMD-9. 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).

Le premier domaine est composé d'une séquence signal de 35 résidus d'acides aminés clivée lors de l'exportation par le system Sec. Le suivant est composé d'un propeptide formé de 109 résidus d'acides aminés qui sera enlevé lors de la maturation de l'enzyme. Le domaine PR de 495 résidus d'acides aminés constitue la partie N-terminale de la protéine mature et correspond au domaine catalytique. Le domaine catalytique renferme la triade catalytique d'une protéase à sérine impliquant un résidu d'acide aspartique, un résidu de sérine et un résidu d'histidine. Ce domaine renferme un sous-domaine appelé I pour insertion (~ 150 résidus) qui pourrait moduler la spécificité du substrat. Le domaine A est globulaire, composé de 438 résidus d'acides aminés, et sa fonction n'est pas clairement identifiée. Il est essentiel à l'activité protéolytique et serait impliqué dans la régulation de l'activité protéolytique et/ou la spécificité du domaine PR (Siezen, 1999). La partie C-terminale de la protéine comporte, quant à elle, trois domaines : un domaine Hélicoïdal (H) de 367 résidus

d'acides aminés, un domaine hydrophobe de 106 résidus acides aminés (W), qui interviendrait dans le mécanisme d'ancrage à la membrane cellulaire, et enfin, le domaine d'ancrage au peptidoglycane (AN) contenant 35 résidus d'acides aminés dont un motif d'ancrage LPNTG. Enfin, la protéase membranaire PrtS de *St. thermophilus* comme celle des autres streptocoques ne contient pas de domaine B. Ce domaine participant probablement à la stabilité est très conservé chez les homologues de PrtS d'autres bactéries lactiques (Fernandez-Espla *et al.*, 2000).

- Ancrage de PrtS

PrtS est liée de façon covalente au peptidoglycane grâce au motif LPNTG reconnu par la sortase A (SrtA) (Fernandez-Espla *et al.*, 2000). Ce mécanisme d'ancrage n'a pas été étudié chez *St. thermophilus* mais a été déduit du mécanisme connu chez de nombreuses bactéries à Gram<sup>+</sup>, notamment chez *Staphylococcus aureus* (Figure 7). Une protéine ancrée possède une séquence signal (SS) adressant la protéine vers l'extérieur et un domaine conservé à son extrémité C-terminale qui est nécessaire et suffisant pour l'ancrage. Cette ancre est constituée de trois parties : un motif LPXTG, suivi par une séquence composée d'une vingtaine de résidus d'acides aminés majoritairement hydrophobes et une courte queue de résidus chargés, le plus souvent positivement (sorting signal), qui permettent à la protéine d'être retenue dans la membrane plasmique. La sortase A située au niveau de la membrane plasmique comporte deux activités enzymatiques. L'activité endopeptidasique qui va permettre le clivage de la liaison peptidique entre les résidus de thréonine et de glycine du motif LPXTG de la protéine à ancrer. Il y a formation d'une liaison thioester entre le résidu de cystéine du site actif de la sortase et le groupement  $\alpha$ -carboxylique du résidu de thréonine du motif d'ancrage. La deuxième activité qui est transpeptidasique va catalyser l'attaque nucléophile d'une fonction amine du peptidoglycane vers la liaison thioester donnant lieu à la formation d'une liaison amide entre la fonction  $\alpha$ -carboxylique du résidu de thréonine et d'une fonction amine du peptidoglycane, libérant ainsi la sortase (Figure 7) (Mazmanian *et al.*, 2001; Ton-That *et al.*, 2004). Des mutants *srtA* ne sont pas capables d'ancrer certaines protéines de surface dont de nombreuses protéines de virulence et de causer certaines infections animales (Mazmanian *et al.*, 2001). Chez *Lc. lactis*, deux gènes spécifiant des sortases putatives, *srtA* et *srtB* ont été identifiés. Les travaux menés dans l'équipe de Juillard et Piard ont montré que l'inactivation du gène *srtA* affectait l'ancrage d'une protéine modèle ayant pour motif d'ancrage la séquence LPKTG.



**Figure 7 : Mécanisme d'ancrage à la paroi cellulaire des protéines de surface de *Staphylococcus aureus***

(i) L'exportation : Les précurseurs des protéines de surface contenant une séquence signal N-terminale sont exportés à travers le système Sec, et la séquence signal est clivée. (ii) La rétention : Le produit de cette réaction est retenu *via* son domaine C-terminal hydrophobe "sorting signal" dans le système de la sécrétion. (iii) Le clivage : La sortase clive la liaison peptidique entre les résidus de thréonine (T) et de glycine (G) du motif LPXTG, générant la formation d'une liaison thioester entre le résidu de cystéine du site actif de la sortase et le groupement  $\alpha$ -carboxylique du résidu de thréonine du motif d'ancrage. (iv) L'ancrage : La fonction amine libre du lipide II (précurseur de la biosynthèse du peptidoglycane) attaque l'acyl-enzyme intermédiaire, liant le résidu de thréonine de la protéine de surface au pentaglycine (Gly<sub>5</sub>) du lipide II, régénérant le site actif de la sortase. (v) L'incorporation dans l'enveloppe cellulaire : Les protéines de surfaces liées aux lipides sont incorporées dans la paroi cellulaire via la réaction de transglycosylation.

A l'inverse, l'inactivation du gène *srtB* n'a pas d'effet notable sur l'ancrage de cette protéine. Les auteurs suggèrent donc que les deux sortases SrtA et SrtB n'ont pas la même spécificité de substrat (Juillard & Piard, 2008). Les mécanismes d'ancrage semblent être très semblables entre les streptocoques et les lactocoques puisque l'expression hétérologue de protéines contenant le motif LPXTG (provenant de *St. pyogenes*) conduit à un ancrage correct chez différentes bactéries lactiques dont *St. thermophilus* (Piard *et al.*, 1997).

- Variabilité du gène *prtS*

Il était admis de longue date que la plupart des souches de *St. thermophilus* n'était pas protéolytique, donc incapable de dégrader les caséines du lait. Une activité protéolytique de surface a été recherchée chez 97 souches de *St. thermophilus* et seules 3 d'entre elles ont présenté un niveau d'activité protéolytique équivalent à celui habituellement rencontré chez les lactocoques. Comparées aux autres souches testées, ces trois souches présentaient une croissance en lait plus rapide et une plus forte production d'acide lactique (Shahbal *et al.*, 1991). Ainsi, parmi les trois souches de *St. thermophilus* dont le génome est entièrement séquencé (LMG18311, CNRZ1066 et LMD-9), seule la souche LMD-9 possède le gène *prtS*. Néanmoins, des études récentes ont démontré une émergence du gène *prtS* au sein des collections de souches de *St. thermophilus* (Galia *et al.*, 2009; Rasmussen *et al.*, 2008).

*St. thermophilus* aurait acquis le gène *prtS* par transfert horizontal d'un streptocoque commensal et/ou pathogène proche de *St. suis* (paragraphe 2.3.2.2.) (Delorme *et al.*, 2010). Ce gène est très répandu au sein de l'espèce *St. suis* puisqu'il est présent chez l'ensemble des souches testées quelque soit leur sérotype (Bonifait *et al.*, 2010; Delorme *et al.*, 2010).

Dans une étude phylogénétique portant sur 47 souches de *St. thermophilus*, 2250 oligonucléotides (de 65 à 75 mer) ont été utilisés pour construire des puces à ADN, à partir de 3 souches dont le génome est entièrement séquencé. Le gène *prtS* a été retrouvé dans 35 des 47 souches étudiées. Sur les 12 ne le possédant pas, 8 est regroupées dans le plus important sous groupe de la collection (Rasmussen *et al.*, 2008). Ces souches présentent 39 gènes absents dans plus de la moitié des autres souches. A l'inverse, elles sont dépourvues de 20 gènes retrouvés dans plus de 50% des autres souches. Les 39 gènes trouvés dans le sous groupe des souches *prtS*<sup>-</sup> sont impliqués dans le transport de plusieurs acides aminés, des transporteurs de maltose/maltodextrine, des systèmes de consommation du fer et des régulateurs transcriptionnels. L'absence du gène *prtS* pourrait ainsi être compensée par la présence des gènes supplémentaires dont ceux impliqués dans le transport de certains acides aminés (Rasmussen *et al.*, 2008). Dans l'étude de Galia *et al.*, 2009, le gène *prtS* a été détecté dans 23 des 30 souches étudiées (Galia *et al.*, 2009).

Une autre étude phylogénétique basée sur la technique de MLST a été réalisée sur 27 souches de *St. thermophilus* dont 8 souches *prtS*<sup>+</sup>. L'analyse des profils alléliques de 8 gènes de ménage (*ilvC*, *pepO*, *pyrE*, *glcK*, *ddlA*, *thrS*, *dnaE* et *tkl*) et des clusters phylogénétiques montre que les souches *prtS*<sup>+</sup> de *St. thermophilus* n'appartiennent pas au même cluster. L'analyse nucléotidique d'un fragment du gène *prtS* a permis de mettre en évidence

l'existence de trois allèles avec une divergence génétique maximale de 2,9% contre 1,3% chez les trois allèles trouvés chez *St. suis* (Delorme *et al.*, 2010).

La séquence protéique de la protéase de la souche LMD-9 présente une forte identité avec la protéase de paroi de *St. suis* (95,9%) contre 49,5% pour celle de *St. agalactiae* (Bonifait *et al.*, 2010; Delorme *et al.*, 2010; Galia *et al.*, 2009; Harris *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2010). La plus grande différence entre la protéase PrtS de la souche LMD-9 et celle de *St. suis* est une duplication de 32 résidus d'acides aminés retrouvée au niveau du propeptide (Figure 6) (Delorme *et al.*, 2010; Galia *et al.*, 2009). Cette duplication est présente également dans l'allèle de la souche JIM8232, mais est absent dans l'allèle de la souche CNRZ385. Il a été proposé par Delorme *et al.*, (2010) et Galia *et al.*, (2009) l'hypothèse selon laquelle cette duplication permettrait au prodomaine, qui joue un rôle de chaperone chez les protéases appartenant à la famille des subtilisines, d'adopter un repliement correct permettant une bonne maturation de la protéase PrtS. Ainsi, cette duplication pourrait correspondre à une adaptation résultant d'une mutation apparue suite à l'acquisition par *St. thermophilus* du gène *prtS* (Delorme *et al.*, 2010; Galia *et al.*, 2009; Subbian *et al.*, 2004).

- Caractéristiques biochimiques de PrtS de *St. thermophilus* CNRZ 385

La masse moléculaire de PrtS a été déterminée par électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE) et estimée à 153 kDa. Sa température optimale d'activité ainsi que la gamme de pH, sur laquelle elle est active, ont été déterminées en utilisant un substrat synthétique (Ac-Ala-Ala-Pro-Phe-pNa). L'enzyme est active sur une gamme de pH comprise entre 5,5 et 8,5 avec un maximum d'activité observé à pH 7,5. La température optimale d'activité déterminée avec ce substrat est de 37°C (Fernandez-Espla *et al.*, 2000).

L'utilisation de différents inhibiteurs a permis de conclure que cette enzyme est une protéase à sérine. En effet, elle est fortement inhibée en présence de phénylméthylsulfonylfluorure (PMSF) et de chymostatine. Avec une concentration de PMSF à 1 mM ou de chymostatine à 0,1 mM, la protéase est inhibée respectivement à 100% et 75%, alors qu'elle ne l'est qu'à 30% par un agent chélatant (EDTA, 1mM). La bestatine (0,01M), inhibiteur d'aminopeptidase, est sans effet sur l'activité de la protéase. Enfin, similairement à la protéase PrtB de *Lb. bulgaricus* ATCC11842 et CNRZ397, il a été observé que le CaCl<sub>2</sub> active fortement la protéase PrtS, l'activité initiale augmentant de 2 à 10 fois après addition de 2 à 10 mM de CaCl<sub>2</sub> (Arioli *et al.*, 2007; Fernandez-Espla *et al.*, 2000).

La spécificité de substrat de cette enzyme a été déterminée et comparée à celle d'autres protéases de paroi de bactéries lactiques. Pour cela, divers substrats synthétiques ont été testés

(Tableau 5) (Fernandez-Espla *et al.*, 2000). PrtS est ainsi capable d'hydrolyser les 4 substrats comportant un résidu d'acide aminé aromatique à la position P1 et un résidu prolyl à la position P2. Cette enzyme est également capable d'hydrolyser la caséine  $\alpha_{S1}$  et la caséine  $\beta$  (Fernandez-Espla *et al.*, 2000). Ainsi, elle hydrolyse la caséine totale et la caséine  $\beta$  avec la même préférence, donc similairement à la protéase type PIII des lactocoques, PrtS ne présente pas une préférence pour la caséine  $\beta$  (Fernandez-Espla *et al.*, 2000).

**Tableau 5 : Activité de PrtS de *St. thermophilus* CNRZ 385 sur différents substrats chromogéniques (Fernandez-Espla *et al.*, 2000)**

Substrat	Activité (%)
Ac-Ala-Ala-Pro-Phe-pNa	100
MS-Arg-Pro-Tyr-pNa	100
S-Val-Pro-Phe-pNa	89
S-Val-Glu-Pro-Phe-pNa	22
Bz-Phe-Val-Arg-pNa	0
NZbz-Gly-Pro-Arg-pNa	0
Z-Phe-Arg-pNa	0

Abréviations : Bz, benzoyl; Z, benzyloxycarbonyl.

Chez *St. thermophilus*, même si la protéase PrtS est similaire à la protéase de streptocoques pathogènes, elle n'a pas conservé la même fonction. En effet, elle est plutôt liée à la croissance dans le lait (Galia *et al.*, 2009; Shahbal *et al.*, 1991). La protéase hydrolyse les caséines du lait en peptides qui sont ensuite assimilés par *St. thermophilus*. Une bonne croissance permet d'obtenir un pouvoir acidifiant élevé. En effet les souches dépourvues de cette protéase ne trouvent que très peu de peptides et d'acides aminés libres dans le lait, et présentent une croissance lente donc un pouvoir acidifiant faible (Galia *et al.*, 2009; Shahbal *et al.*, 1991).

- Protéase HtrA

Une seconde endopeptidase extracellulaire est présente chez *St. thermophilus*, la protéase HtrA. Il s'agit d'une protéase à sérine qui pourrait être impliquée dans la dégradation des protéines sécrétées mal repliées (Hols *et al.*, 2005).

Chez *Lc. lactis* une protéase membranaire de la famille HtrA/DegP a été identifiée dans la souche IL1403. L'inactivation de son gène a ensuite montré qu'elle assure, à la surface cellulaire, une fonction de ménage en éliminant des protéines anormales et/ou mal repliées, et qu'elle est aussi responsable de la maturation des protéines exportées, comme la bactériolysine AcmA de *Lc. lactis* (Poquet *et al.*, 2001).

Ainsi, HtrA de *Lc. lactis* partage des caractéristiques et des fonctions communes avec HtrA d'*E. coli*. Ces enzymes sont essentielles à la croissance à haute température et ont un rôle dans la dégradation des protéines non fonctionnelles de surfaces (Foucaud - Scheunemann et Poquet, 2003; Pallen et Wren, 1997; Poquet *et al.*, 2001; Strauch et Beckwith, 1988).

- maturation des protéases chez les bactéries Gram<sup>+</sup>

Les peptidyl-prolyl isomérasés (PPIases) sont des foldases qui accélèrent le changement conformationnel cis/trans au niveau des liaisons peptidyl-proline (Xaa-Pro) au cours du repliement des protéines (Hermans *et al.*, 2006; Rahfeld *et al.*, 1994). Une telle isomérisation pourrait être importante pour un repliement correct et efficace des protéines (Drouault *et al.*, 2002). Ces isomérasés sont classés en trois familles distinctes, à savoir la parvuline, les protéines de liaison FK506 (FKBP) et la cyclophiline (Cron *et al.*, 2009).

Chez les bactéries Gram<sup>+</sup>, la protéine PrsA appartient à la famille de la parvuline. Il s'agit d'une lipoprotéine membranaire connue pour être impliquée dans l'exportation et la maturation des protéines (Vitikainen *et al.*, 2004). Il a été démontré par construction de mutants que le domaine de type parvuline ainsi que les deux extrémités N- et C- terminaux sont essentiels dans la fonction de la protéine PrsA dans la sécrétion des protéines et la croissance des bactéries (Vitikainen *et al.*, 2004). Les gènes codant pour les lipoprotéines PrsA-like (PLP) sont présents en plusieurs copies : chez *B. subtilis* (*prsA* et *yacD*), *St. pyogenes* (2 copies), *C. difficile* (3 copies) et *Lc. lactis* (*pmpA* et *prtM*). L'alignement de ces lipoprotéines montre que les différentes copies présentes chez *C. difficile* et *St. pyogenes* sont plus liées les unes avec les autres qu'avec leurs homologues des autres génomes étroitement liés, suggérant que ces différentes copies sont dues à une duplication de gènes. Ce n'est pas le cas de *prsA* et *yacD* chez *B. subtilis* et de *pmpA* et *prtM* chez *Lc. lactis*. Chez cette

dernière le gène *prtM* est porté par un plasmide et flanqué par des éléments IS, suggérant son acquisition par transfert horizontal (Drouault *et al.*, 2002; Haandrikman *et al.*, 1989).

Chez *B. subtilis*, la protéine PrsA est une lipoprotéine membranaire qui aiderait le repliement des protéines exportées et stabiliserait ces protéines entre la membrane cytoplasmique et la paroi cellulaire. De plus, une partie de la protéine PrsA présente une homologie avec l'isomérase (cis/trans peptidyl-prolyl) de type parvuline (Vitikainen *et al.*, 2004).

Chez *Lc. lactis*, la protéine PrtM est impliquée dans la maturation de la protéase à sérine PrtP (Haandrikman *et al.*, 1989). Elle appartient à la famille des Peptidyl Prolyl cis/trans Isomérases (PPIases). De plus, un gène homologue de *prsA* de *B. subtilis* a été caractérisé et annoté *pmpA* chez *Lc. lactis*. Ce gène code une lipoprotéine de 309 résidus (Bolotin *et al.*, 2001; Drouault *et al.*, 2002). Par homologie de séquence, la protéine PmpA de *Lc. lactis* pourrait avoir une activité de foldase qui faciliterait la sécrétion des protéines (Drouault *et al.*, 2002). La transcription du gène *pmpA* est augmentée lorsque la source azotée est limitée. Ces résultats suggèrent que l'expression du gène *pmpA* est nécessaire pour le repliement des facteurs impliqués dans la nutrition azotée, tels que la protéase de paroi cellulaire ou les trois systèmes de transport de peptides Opp, DtpT et DtpP qui sont induits dans les mêmes conditions (Drouault *et al.*, 2002; Guédon *et al.*, 2001b).

Enfin, lorsque la lipase de *Staphylococcus hyicus* est produite de façon hétérologue chez *Lc. lactis*, une grande partie de la lipase exportée semble être dégradée. Cela pourrait être dû à une maturation non complète (Drouault *et al.*, 2000). De plus, le défaut de translocation de cette lipase chez *Lc. lactis* est augmenté dans un mutant *pmpA*<sup>-</sup>. Ainsi la protéine PmpA jouerait un rôle dans le repliement de certains facteurs impliqués dans la sécrétion de certaines protéines (Drouault *et al.*, 2002).

Chez les pneumocoques, quatre PPIases putatives ont été identifiées sur le génome. Deux PPIases sont produites sous forme de lipoprotéines associées à la surface : la putative protéase de maturation de la protéine A (PpmA) et la rotamase A (SlrA) (Cron *et al.*, 2009). La protéine PpmA a été identifiée chez *St. pneumoniae* par homologie de séquences avec la protéine PrtM de *Lc. lactis* (Overweg *et al.*, 2000a, 2000b). De plus, cette protéase de maturation a également une homologie de séquences avec des membres de la famille des peptidyl-prolyl cis/trans isomérases. Comme pour PrtM des bactéries lactiques, PpmA pourrait fonctionner comme une isomérase liée à la membrane cellulaire. La partie N-terminale de cette protéine sert de signal de translocation à travers la membrane cellulaire (Overweg *et al.*, 2000a). La protéine PpmA serait impliquée dans la virulence de

*St. pneumoniae*. D'une part, les différents variants phénotypiques de *St. pneumoniae* présentent des différences d'expression de cette protéine (Overweg *et al.*, 2000b). D'autre part, une mutation du gène *ppmA* chez la souche D39 aboutit à une baisse de virulence chez la souris (Overweg *et al.*, 2000a). Chez *St. pneumoniae*, PpmA pourrait accélérer le repliement des protéines excrétées et être impliquée dans l'adhésion via la maturation des composants de surface ou l'activation de protéases ou d'autres protéines sécrétées. La maturation des protéines cibles deviendrait lente en absence de la protéine PpmA conduisant non pas à une élimination des protéines cibles mais à leur mauvaise conformation. La réduction de la virulence des mutants *ppmA*<sup>-</sup> pourrait aussi être due à la présence d'une autre isomérase encore inconnue qui se substitue partiellement à l'activité de la protéine PpmA (Overweg *et al.*, 2000a).

Concernant la protéine rotamase A (SlrA), il s'agit d'une isomérase (PPIase) fonctionnelle du type cyclophiline impliquée dans la colonisation des pneumocoques. Ainsi, les mutants *slrA*<sup>-</sup> sont rapidement éliminés des voies aériennes supérieures chez la souris (Hermans *et al.*, 2006).

Plusieurs études ont également indiqué le rôle des PPIases dans la virulence d'autres bactéries que *St. pneumoniae*. Chez *St. pyogenes*, le facteur RopA est considéré comme responsable de la sécrétion et la maturation de plusieurs facteurs de virulence dont la protéase à cystéine SpeB (Lyon *et al.*, 1998). RopA est une protéine chaperone associée au ribosome qui, grâce à son activité PPIase, peut jouer le rôle d'une isomérase. Chez une souche mutante *ropA*<sup>-</sup>, l'activité de la protéase SpeB est très affectée (environ 20% par rapport à la souche sauvage *ropA*<sup>+</sup>). De plus, la substitution d'un résidu de proline (position 78) située dans le pro-domaine de la protéase (SpeB) par un résidu de glycine, donne la même activité (80% par rapport à la souche sauvage *ropA*<sup>+</sup> SpeB<sup>+</sup>) que la souche soit *ropA*<sup>-</sup> ou *ropA*<sup>+</sup>. Ceci implique que l'activité PPIase du facteur RopA n'est plus utile quand le résidu de proline en position 78 n'est plus présent, suggérant que ce résidu est la cible de ce facteur. Ces données appuient un modèle dans lequel le facteur RopA déclenche l'isomérisation du résidu de proline influant la conformation du pro-domaine qui dirige à son tour la protéase dans l'un des nombreux chemins de repliement alternatif (Lyon et Caparon, 2003). De plus, il a été démontré que le facteur RopA joue un rôle important dans deux étapes distinctes dans la biogenèse d'une protéase active. Premièrement, un mutant RopA<sup>-</sup> était capable de produire la protéase mais incapable de la sécréter, suggérant que ce facteur est nécessaire pour l'adressage de la protéase à la voie de la sécrétion. Deuxièmement, une délétion dans la région centrale du facteur RopA, en respectant le cadre de lecture, a abouti à un niveau normal d'expression de

la protéase en forme zymogène (non mature). Cependant, la protéase sécrétée à partir de ce mutant a montré un défaut de maturation, notamment dans la cinétique de l'auto-transformation de la forme zymogène à celle mature (Lyon *et al.*, 1998). Ainsi, sur les trois domaines définis du facteur RopA, les deux domaines N- et C- terminaux interagissent ensemble et sont nécessaires pour la liaison au substrat (Zarnt *et al.*, 1997). De plus, le domaine N- terminal est nécessaire pour se fixer au ribosome (Hesterkamp *et al.*, 1997). Enfin, le domaine central présente une homologie avec les protéines de la famille FK506 (Göthel *et al.*, 1997; Hesterkamp et Bukau, 1996; Stoller *et al.*, 1996). Ces protéines sont capables, grâce à leur activité PPIase, de catalyser l'isomérisation de la liaison peptidique qui précède un résidu prolyl situé dans le pro-domaine du substrat. Cette isomérisation peut être une étape limitante dans le repliement des protéines (Kiefhaber *et al.*, 1990). Ainsi, l'état d'isomérisation d'un seul résidu prolyl et l'emplacement de ce résidu prolyl dans le pro-domaine pourrait influencer la conformation du pro-domaine qui dirige à son tour la protéase dans un des chemins de repliement alternatif (Lyon et Caparon, 2003). Ces données confirment le modèle suivant. Au cours de la traduction de l'ARNm de la protéase, le facteur RopA se lie au pro-domaine (par ses deux extrémités N et C terminales) lors de sa sortie du ribosome. Cette interaction est essentielle pour stabiliser la préprotéase pour avoir une conformation optimale pour la sécrétion. Puis, le complexe (facteur RopA/préprotéase) est adressé vers la bonne voie de sécrétion à travers la membrane cellulaire. Au cours de cette interaction, le domaine central du facteur RopA ayant une activité PPIase entraîne l'isomérisation du résidu prolyl situé en position 78 du pro-domaine. Une fois la protéase sécrétée, elle se replie dans sa forme zymogène via une voie de repliement influencée par l'état d'isomérisation du P78 (Lyon et Caparon, 2003). Donc, l'élément clé de ce modèle est basé sur l'idée que la conformation du pro-domaine fournit des informations stériques qui influent le choix de la voie de repliement ultérieure. La mutation d'un seul résidu d'acide aminé dans le pro-domaine de la protéase appartenant à la famille de subtilisine aboutit à une conformation tridimensionnelle modifiée de la protéase active chez le mutant par rapport au type sauvage, même si au final la séquence primaire de la protéine mature est identique. Ces données ont été interprétées par le fait que le pro-domaine influence le repliement de la protéase active, donc le positionnement des résidus du site actif (Lyon et Caparon, 2003; Shinde *et al.*, 1997, 1999; Tao *et al.*, 1994).

### 3.2.2. Systèmes de transport

Des gènes codant potentiellement des systèmes de transport d'acides aminés, de peptides et d'oligopeptides ont été identifiés chez *St. thermophilus*, mais peu d'entre-eux ont été caractérisés au niveau fonctionnel.

#### 3.2.2.1. Le transport des oligopeptides

Chez les BL, le transport d'oligopeptides se fait via un transporteur ABC. Le transporteur ABC de *Lc. lactis*, appelé Opp, a été bien caractérisé et est utilisé comme modèle d'étude. Il s'agit d'un système ATP-dépendant car l'addition de vanadate, inhibiteur d'ATPase, inhibe entièrement le système (Kunji *et al.*, 1993; Tam et Saier, 1993). Chez *St. thermophilus*, ce système est appelé système Ami et constitue le seul système caractérisé en détail chez une souche industrielle, ST18. Ce transporteur ABC est essentiel pour la croissance en lait (Garault *et al.*, 2002).

Il se compose chez les bactéries en général et *St. thermophilus* en particulier, de 2 protéines transmembranaires (AmiC et D), de 2 protéines cytoplasmiques liant l'ATP (AmiE et F) et de la (des) protéine(s) liant les oligopeptides (AmiA) (Figure 4) (Garault *et al.*, 2002; Tynkkynen *et al.*, 1993). Chez les bactéries Gram<sup>-</sup>, la protéine OppA est périplasmique alors qu'elle est liée à la membrane cytoplasmique chez les bactéries Gram<sup>+</sup>. Une deuxième différence est observée au niveau des systèmes de transport d'oligopeptides entre les bactéries Gram<sup>+</sup> et les bactéries Gram<sup>-</sup> concernant la taille des peptides transportés. Ainsi, chez les bactéries Gram<sup>-</sup> telles qu'*Escherichia coli* ou *Salmonella typhimurium*, la taille des peptides transportés excède rarement 6 résidus d'acides aminés et cette taille est liée à celle des pores membranaires (Payne et Smith, 1994). Chez les bactéries Gram<sup>+</sup>, la taille des peptides transportés est plus variable (Alloing *et al.*, 1994; Jenkinson *et al.*, 1996; Lanfermeijer *et al.*, 1999).

- Caractéristiques des peptides transportés par le système Opp

Dans le cas des transporteurs ABC, 2 types de spécificité doivent être distinguées : celle de la protéine affine et celle de la perméase. Par exemple, chez *Lc. lactis* ssp. *lactis* la taille maximale des peptides fixés par la protéine affine aux oligopeptides est de 35 résidus alors que celle de la perméase (formée par OppB et OppC) est de 18 résidus (Detmers *et al.*, 1998, 2000). Chez *St. thermophilus* ST18, Garault *et al.*, (2002) ont comparé la croissance en lait et en milieu MCD (Milieu chimiquement défini) supplémenté avec des peptides de mutants

simples des 3 protéines affines pour les oligopeptides (AmiA1, AmiA2, AmiA3) et de mutants doubles et triple.

Il a ainsi été démontré que la spécificité des trois protéines AmiA1, 2 et 3 se chevauche et que l'ensemble du système permet le transport de peptides contenant de 5 à 23 résidus d'acides aminés (taille des peptides testés), alors que chez les autres streptocoques il n'y a pas ou peu de transport de peptides de plus de 10 résidus d'acides aminés. Le transport de peptides basiques et hydrophobes semble être favorisé (Garault *et al.*, 2002).

Chez les autres bactéries, la taille des peptides testés était limitée. Chez *Listeria monocytogenes*, parmi les peptides testés, le système Opp permet le transport de peptides de 8 résidus et ne permet pas celui de peptides de 9 résidus (Verheul *et al.*, 1998). Chez *St. gordonii*, le système Hpp (qui correspond au système Opp chez les autres espèces) transporte des peptides de 6 à 7 résidus (Jenkinson *et al.*, 1996). Chez *St. pneumoniae*, le système Ami permet la translocation de peptides de 2 à 7 résidus (Alloing *et al.*, 1994).

Le système de transport Ami de *St. thermophilus* semblerait donc se distinguer des autres systèmes Opp par la taille importante des peptides transportés.

- Caractéristique et variabilité génétiques du système de transport Opp

Les gènes qui codent les protéines du système Opp se retrouvent généralement en opéron (Figure 8). L'ordre de ces gènes est assez bien conservé chez la plupart des bactéries Gram<sup>+</sup> comme *B. subtilis*, *St. pyogenes*, *St. pneumoniae* et *L. monocytogenes*, où le gène codant la protéine affine aux oligopeptides est situé en amont des quatre autres gènes de l'opéron.

Chez *St. thermophilus* ST18, la région comportant tout ou partie du système de transport Ami a été identifiée grâce à la caractérisation de mutants insertionnels déficients pour le transport de peptides, puis clonée. Une séquence de 7032 pb a été établie et cinq gènes organisés en opéron ont été identifiés (Garault *et al.*, 2002). Il s'agit des gènes *amiA1*, *amiB*, *amiC*, *amiD* et *amiE*. L'ordre de ces gènes correspond donc à celui classiquement retrouvé. Cet opéron comprend un seul promoteur situé en amont du gène *amiA1*, et un seul terminateur en aval de *amiE*. La transcription du gène *amiA1* est donc associée à celle de l'ensemble de l'opéron, comme c'est également le cas chez *St. pneumoniae* (*amiA*) et *St. gordonii* (*hppA*). Par contre, chez *St. pyogenes* et *L. monocytogenes*, *oppA* peut être transcrit indépendamment grâce à la présence d'un terminateur faible en aval d'*oppA* (Borezee *et al.*, 2000; Podbielski *et al.*, 1996). Chez *Lc. lactis*, l'opéron *oppDFBCApepO1* comprend deux promoteurs situés en amont des gènes *oppD* et *oppA*, et deux terminateurs situés en aval des gènes *oppA* et *pepO1* (le gène *pepO1* code pour une oligopeptidase) (Guédon *et al.*, 2001b). Donc chez *Lc. lactis*, le

gène *oppA* peut également être transcrit indépendamment des quatre autres gènes *oppDFBC*. Enfin, l'organisation génétique de ces opérons est sujette à des variations en fonction de l'espèce considérée (Figure 8). Les séquences déduites des cinq protéines de *St. thermophilus* présentent de fortes homologues avec des protéines homologues d'autres streptocoques, dont *St. pneumoniae* (62% d'identité pour AmiA1 et 86% d'identité pour AmiE). Ce système de transport est de type ABC, les oligopeptides se fixent à la protéine AmiA1, les deux protéines membranaires AmiC et AmiD forment le pore et les deux ATPases AmiE et AmiF fournissent l'énergie (Figure 4).

- Rôle du système Opp dans la nutrition azotée

Le système de transport d'oligopeptides joue un rôle essentiel dans la nutrition azotée chez les bactéries et tout particulièrement chez les BL qui sont auxotrophes pour certains acides aminés (Braquart et Lorient, 1977; Deguchi et Morishita, 1992; Morishita *et al.*, 1981; Neviani *et al.*, 1995).

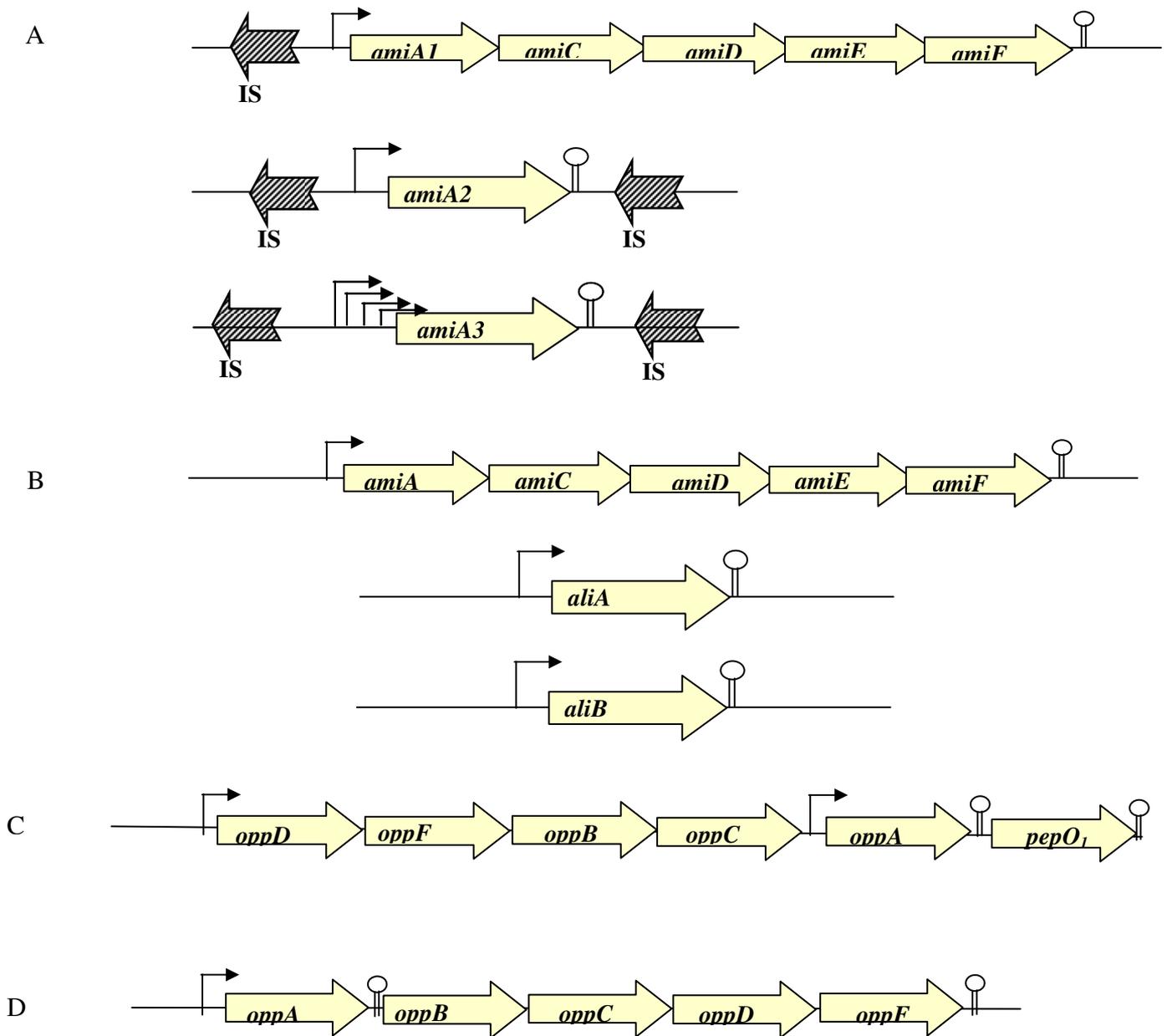
Il a été montré qu'un mutant Ami<sup>-</sup>, obtenu par mutagenèse insertionnelle dans l'opéron *amiA<sub>1</sub>CDEF*, était incapable d'avoir une croissance rapide dans le lait. Le taux de croissance de ce mutant était de 0,19 h<sup>-1</sup> contre 0,79 h<sup>-1</sup> pour la souche sauvage ST18, ce qui montre l'importance de ce système dans la croissance en lait (Garault *et al.*, 2002).

L'étude de la croissance en milieu lait de différentes souches de *St. thermophilus*, possédant ou non PrtS, a révélé que des souches possédant PrtS présentent une croissance diauxique et que PrtS est exprimée au cours de la deuxième phase exponentielle (Letort *et al.*, 2002). Ce résultat peut suggérer que le système de transport Ami permet chez les souches possédant PrtS d'initier la croissance dans le lait en utilisant les oligopeptides initialement présents. Ensuite, durant la deuxième phase exponentielle de croissance, phase au cours de laquelle PrtS est exprimée, les peptides produits par la dégradation des caséines sont transportés par ce système pour être utilisés par les cellules (Letort *et al.*, 2002).

Chez *St. pneumoniae* et *St. gordonii*, il permet la croissance dans un milieu complexe dont la source azotée est apportée sous forme de peptides (Alloing *et al.*, 1996; Jenkinson *et al.*, 1996).

- Rôle du système Opp dans la régulation de gènes

Chez *St. thermophilus*, le système de transport des oligopeptides joue un rôle important dans la nutrition azotée mais ce système peut également affecter indirectement l'expression des



**Figure 8 : Organisation des gènes codant les sous unités des transporteurs des oligopeptides chez différentes espèces bactériennes**

*St. thermophilus* ST18 (A) ; *St. pneumoniae* (B) ; *Lc lactis* (C) ; *St. pyogenes* (D) (Alloing *et al.*, 1994; Borezee *et al.*, 2000; Guédon *et al.*, 2001b; Podbielski *et al.*, 1996).

gènes par un rôle de “renseignement” sur les conditions environnementales (quorum-sensing).

Chez *St. thermophilus* LMD-9, il a été remarqué que l’expression d’un petit peptide hydrophobe (SHP) est nécessaire à la transcription du gène STE-1357 codant un peptide appelé Pep1357C. La production de ce peptide (Pep1357C) et l’expression de son gène sont liées à la composition du milieu mais aussi à la phase de croissance (Ibrahim *et al.*, 2007). Ainsi, elles augmentent dans un milieu sans peptide par rapport à un milieu riche en peptides et cette différence est beaucoup plus prononcée au milieu de la phase exponentielle de croissance. Cela suggère que l’expression de ce peptide est dépendante du système "quorum-sensing". L’auteur propose que *St. thermophilus* LMD-9 sécrète le petit peptide hydrophobe (SHP) dans le milieu de culture et à partir d’une certaine concentration le système Ami peut capter et internaliser ce peptide à l’intérieur des cellules. Ce peptide pourrait alors contrôler l’activation du régulateur Rgg1358 par une interaction protéine-protéine. Ce dernier, à son tour, pourrait activer la transcription du gène STER-1357 codant le peptide Pep1357C (Ibrahim *et al.*, 2007). Le rôle des régulateurs appartenant à la famille multigénique *rgg* a été étudié chez les streptocoques pathogènes. Ils régulent des gènes de nature variée, souvent nécessaires à la survie des cellules en conditions de stress et à la colonisation de leurs hôtes (Chaussee *et al.*, 2003, 2004). Ils sont impliqués, chez *St. pyogenes*, dans l’expression de plusieurs protéines associées à la virulence et localisées sur la paroi cellulaire (Chaussee *et al.*, 2003). Chez *St. thermophilus*, le cluster *rggC* (*rggC1* et *rggC2*) est impliqué dans la survie des cellules en condition de stress oxydant (Fernandez *et al.*, 2006).

Un deuxième exemple plus récent montre l’implication indirecte du système Ami dans la régulation des gènes via le système "quorum-sensing" où les cellules de *St. thermophilus* LMD-9 non compétentes en milieu riche deviennent compétentes en milieu MCD en début de phase exponentielle. Il a été montré que les deux protéines affines pour les oligopeptides AmiA1 et AmiA3 de la souche LMD-9 contrôlent la compétence des cellules via le contrôle de l’expression du gène *comX*, lui-même impliqué dans le contrôle des gènes de compétence (Gardan *et al.*, 2009). Ces protéines affines aux oligopeptides, surtout la protéine AmiA3, contrôlent indirectement l’expression du gène *comX* par un mécanisme qui implique probablement le transport d’un peptide de signalment (Gardan *et al.*, 2009). L’identification de ce peptide a permis de proposer un modèle (Fontaine *et al.*, 2010). Ce petit peptide hydrophobe (Shp0316) ou ComS (pour Competence Signal) de 24 résidus (MKTLKIFVLFSLLIAILPYFAGCL) est produit sous forme d’un précurseur, lors de la croissance en milieu MCD puis est mûré et sécrété. A partir d’une certaine concentration

dans le milieu extracellulaire, le peptide mature baptisé ComS\* serait internalisé essentiellement par la protéine affine aux oligopeptides AmiA3. ComS\* interagit avec le régulateur Ster\_0316 qui appartient à la famille Rgg et est nommé ComR (Competence Regulator). Le régulateur ComR, à son tour, active la transcription du régulateur ComX d'une part et celle du ComS d'autre part (Fontaine *et al.*, 2010).

Chez les Streptocoques pathogènes, le système (Opp) joue un rôle dans la régulation d'un certain nombre de gènes impliqués dans la nutrition mais aussi dans la virulence des bactéries. Chez *St. pneumoniae*, les protéines affines aux oligopeptides AmiA et PlpA (ou AliA) contrôlent indirectement l'adhérence des bactéries aux cellules eucaryotes en régulant l'expression des ligands impliqués dans l'adhésion par un mécanisme qui implique probablement des molécules de signallement (Cundell *et al.*, 1995). De plus, le système Ami pourrait jouer un rôle essentiel dans la régulation métabolique chez *St. pneumoniae*. Les acides aminés issus de l'hydrolyse des peptides internalisés par ce système joueraient un rôle important dans la régulation générale de gènes impliqués dans plusieurs fonctions comme le transport des acides aminés, la compétence et l'adhérence des cellules (Claverys *et al.*, 2000). Chez *St. pyogenes*, la synthèse de la protéase SpeB, qui est un facteur de virulence et représente une des principales protéines sécrétées dans le milieu de croissance, est réprimée partiellement quand le système Opp est muté (Podbielski *et al.*, 1996). De même, la mutation de la protéine affine aux oligopeptides HppA chez *St. gordonii* réprime l'expression du gène *cshA* codant une adhésine. Cette répression serait provoquée par l'absence de transport d'une molécule produite par les cellules, dans le mutant HppA<sup>-</sup> (McNab et Jenkinson, 1998).

#### 3.2.2.2. Le transport des di et tri peptides

Il existe deux systèmes de transport des dipeptides chez *Lc. lactis* ssp. *lactis* : le système DtpT et le système DppP (ATP-dépendant). Chez *St. thermophilus*, aucun système de transport de di-tripeptides n'a été caractérisé. Par contre, l'analyse des génomes séquencés des trois souches de *St. thermophilus* révèle la présence d'un système de transport proton-dépendant homologue à DtpT de *Lc. lactis* (Bolotin *et al.*, 2004). En revanche, aucun transporteur ATP-dépendant ne semble co-exister avec DtpT chez *St. thermophilus*.

Enfin, le fait que le triple mutant *amiA1/A2/A3* de *St. thermophilus* ST18 est viable dans un milieu contenant des di tri peptides comme unique source azotée suggère la présence d'au moins un autre système de transport impliqué dans le transport de dipeptides mais il n'a pas été identifié (Garault *et al.*, 2002).

Chez *Lc. lactis* ssp. *lactis*, le transporteur DtpT est constitué d'une seule protéine codée par un gène chromosomique monocistronique (Guédon *et al.*, 2001b). La spécificité de ce système de transport a bien été caractérisée chez *Lc. lactis* ssp. *lactis* par constitution de protéoliposomes.

Ainsi, le système DtpT n'a aucune affinité pour les peptides ayant une taille supérieure à 3 résidus donc ce système semble être spécifique des di- tripeptides (Fang *et al.*, 2000). Le système DtpT pourrait également être impliqué d'une manière indirecte dans la régulation de certains gènes du système protéolytique via le régulateur transcriptionnel CodY. En effet, les systèmes de transport des peptides permettent l'internalisation de peptides contenant les acides aminés à chaîne ramifiée (BCAA) qui jouent un rôle de cofacteurs pour le régulateur CodY (Guédon *et al.*, 2001a, 2001b).

### 3.2.2.3. Le transport des acides aminés

Koning *et al.*, (1989) ont décrit trois mécanismes de transport d'acides aminés chez les BL.

- En premier lieu, le transport actif dont l'énergie est fournie par l'ATP ou d'autres composés phosphorylés riches en énergie. Ce mode de transport est unidirectionnel et permet l'accumulation intracellulaire des acides aminés (Driessen *et al.*, 1987). Chez *St. thermophilus*, il est utilisé pour transporter les acides aminés à chaîne ramifiée, la méthionine, la glutamine, et des acides aminés polaires (Hols *et al.*, 2005; Juilliard, 2007). Il est à souligner que le transport des acides aminés branchés chez *St. pneumoniae* est assuré par un système perméase codé par l'opéron *liv*. Chez *St. thermophilus*, comme chez *St. pneumoniae*, le transport de la glutamine est assuré par plusieurs transporteurs de type ABC soulignant l'importance de la glutamine pour la croissance des streptocoques (Hols *et al.*, 2005; Hoskins *et al.*, 2001).

- En second lieu, le transport couplé à la force promotrice qui permet le transport simultané et réversible d'acides aminés et de protons (ou d'autres cations comme le Na<sup>+</sup>). Il est utilisé chez *St. thermophilus* pour transporter l'alanine, la glycine, la sérine et la thréonine (Juilliard, 2007).

- Enfin, le transport par système antiport où la force motrice est dû au gradient chimique des acides aminés transportés. Cet échange ne nécessite donc pas d'énergie (Poolman, 1993). Ainsi, l'entrée d'un acide aminé précurseur est couplée à la sortie d'un produit de ce précurseur comme c'est le cas du couple arginine/ornithine chez *St. thermophilus* (Poolman, 1993).

### 3.2.3. Les peptidases intracellulaires de *St. thermophilus*

La consommation des peptides par les BL dépend, dans un premier temps, de la spécificité des systèmes de transport qui vont les internaliser. Ces peptides seront ensuite hydrolysés par un pool des peptidases intracellulaires dépendant de la souche bactérienne.

En général, les peptidases des BL peuvent être classées selon la position de la liaison peptidique hydrolysée en endopeptidases ou exopeptidases. Les endopeptidases hydrolysent les liaisons peptidiques à l'intérieur de l'oligopeptide. Par contre, les exopeptidases hydrolysent les liaisons peptidiques à partir des extrémités amino (N)- ou carboxy (C-) terminales des chaînes polypeptidiques et sont donc classées en aminopeptidases et carboxypeptidases respectivement.

*St. thermophilus* possède une vingtaine de peptidases (Hols *et al.*, 2005) mais d'un point de vue biochimique quinze peptidases différentes ont été détectés par chromatographie dont 13 sont des homologues à celles de *Lc. lactis* (Rul et Monnet, 1997). Seul un nombre limité d'endo- et aminopeptidases a été caractérisé (PepO, PepA, PepC, PepN, PepS et PepX) (Chapot-Chartier *et al.*, 1994; Chavagnat *et al.*, 2000; Rul et Monnet, 1997; Rul *et al.*, 1994; Tsakalidou *et al.*, 1997). La variabilité du contenu peptidasique intracellulaire ne semble pas avoir été étudiée au sein de *St. thermophilus*, et ce, en dépit du rôle que peuvent jouer les peptidases dans le développement de saveurs dans les fromages (Gagnaire *et al.*, 2001).

Ensuite, seules les différentes peptidases caractérisées chez *St. thermophilus* seront décrites.

#### 3.2.3.1. Les endopeptidases de *St. thermophilus*

L'oligopeptidase PepO est une métallopeptidase à serine, monomérique avec une masse moléculaire de 70 kDa. Comme l'oligopeptidase PepO de *Lc. lactis* ssp. *cremoris* Wg2 et de *Propionibacterium freudenreichii* ATCC 9614, PepO de *St. thermophilus* A a une activité endopeptidasique sur des oligopeptides de 5 à 30 résidus d'acides aminés (Chavagnat *et al.*, 2000; Stepaniak *et al.*, 1998; Tan *et al.*, 1991). Contrairement au gène *pepO* des lactocoques, celui de *St. thermophilus*, tout comme celui de *Lb. helveticus* CNRZ32, ne fait pas partie d'un opéron portant des gènes d'un système de transport des oligopeptides. Le gène *pepO* de *St. thermophilus* est monocistronique et code une protéine de 631 résidus d'acides aminés (Chavagnat *et al.*, 2000).

### 3.2.3.2. Les exopeptidases de *St. thermophilus*

Si certaines peptidases de *St. thermophilus* sont capables de dégrader des protéines à partir de leur extrémité N-terminale (aminopeptidase), aucune peptidase permettant de dégrader des protéines à partir de leur extrémité C-terminale (carboxypeptidase) n'a été caractérisée chez *St. thermophilus*.

#### 3.2.3.2.1. Les aminopeptidases générales

*St. thermophilus* possède deux peptidases générales PepN et PepC qui ont été caractérisées.

- L'aminopeptidase PepN

L'aminopeptidase PepN est une enzyme très conservée parmi les bactéries lactiques. En effet, elle est retrouvée chez les lactocoques, les lactobacilles et les streptocoques (Christensen *et al.*, 1995; Kunji *et al.*, 1996).

Le gène *pepN* code une protéine de 847 résidus d'acides aminés. PepN est une métallopeptidase monomérique avec une masse moléculaire de 96,3 kDa. A l'exception des résidus de proline, de glycine et d'acides aminés acides, l'enzyme PepN a une large spécificité (Chavagnat *et al.*, 1999).

- L'aminopeptidase PepC

L'aminopeptidase PepC est largement présente chez les bactéries lactiques puisqu'elle est retrouvée chez les lactobacilles, les lactocoques, les leuconostokes, les pediocokes et les streptocoques (Chapot-Chartier *et al.*, 1994; Fernandez *et al.*, 1994; Klein *et al.*, 1994; Vesanto *et al.*, 1994; Wohlrab et Bockelmann, 1993). L'aminopeptidase PepC de *St. thermophilus* CNRZ 302 présente 70% d'identité avec son homologue de *Lc. lactis* ssp *cremoris* et 34% avec la bléomycine hydrolase des eucaryotes (Chapot-Chartier *et al.*, 1994). Le gène *pepC* code une protéine de 445 résidus d'acides aminés avec une masse moléculaire calculée de 50,4 kDa. L'analyse biochimique de l'enzyme recombinante a montré que PepC est une aminopeptidase à groupement thiol avec une masse moléculaire de 300 kDa suggérant une structure hexamérique de cette enzyme. La spécificité de l'aminopeptidase PepC a été principalement étudiée en utilisant des dérivés para-nitroanilide et  $\beta$ -naphtylamide d'acide aminé. Ces études ont montré que cette aminopeptidase est capable de libérer une grande gamme d'acides aminés, les acides aminés basiques, hydrophobes neutres, et les résidus acides mais elle est incapable de libérer le résidu proline. De plus, PepC n'a ni une activité sur

les peptides ayant le coté N-terminal bloqué, ni une activité endopeptidasique (Chapot-Chartier *et al.*, 1994).

#### 3.2.3.2.2. Les aminopeptidases spécifiques

Trois aminopeptidases spécifiques PepS, PepA et PepX ont été caractérisées chez *St. thermophilus*. La spécificité de substrat de PepS est plus étroite que l'activité des aminopeptidases générales. Les deux autres aminopeptidases PepA (glutamyl aminopeptidase) et PepX (X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase) hydrolysent des liaisons peptidiques impliquant un acide aminé spécifique.

- L'aminopeptidase PepS

PepS est une métallopeptidase monomérique avec une masse moléculaire calculée de 45,3 kDa (Fernandez-Espla et Rul, 1999). Le gène *pepS* code une protéine de 413 résidus d'acides aminés. Cette peptidase présente la plus grande identité (50%) avec l'aminopeptidase PepS de *B. subtilis* (Fernandez-Espla et Rul, 1999).

Elle est capable d'hydrolyser des oligopeptides de 2 à 10 résidus d'acides aminés (Fernandez-Espla et Rul, 1999). Ainsi, elle hydrolyse les dipeptides composés à l'extrémité N-terminale d'un résidu d'arginine ou d'acide aminé aromatique (Trp notamment). Ces substrats préférentiels sont des dipeptides contenant en position P'1 un acide aminé non chargé (Gly ou Ala). L'activité de cette peptidase est moins efficace (moins de 10% de l'activité maximale testée avec le peptide de référence Trp-Gly) avec les dipeptides ayant du coté N-terminal un autre acide aminé basique (Lys, His) ou hydrophobe (Pro, Met, Leu) (Fernandez-Espla et Rul, 1999). Cette peptidase n'est pas capable de cliver efficacement la liaison X-Pro.

Chez les bactéries lactiques, aucune peptidase (PepX, O, C, P, F, A, V ou T) n'est essentielle pour la croissance en lait. La fonction déficiente d'une peptidase pourrait être compensée par une autre peptidase, ce qui expliquerait que la croissance n'est pas affectée d'une manière significative. Par contre, le fait de muter la peptidase PepS affecte significativement la croissance de *St. thermophilus*. Ainsi aucune autre peptidase ne semble compenser le rôle de PepS et ce même dans un milieu riche comme le milieu M17. La peptidase PepS joue un rôle important dans la croissance de *St. thermophilus* CNRZ385 quelque soit le milieu de culture utilisé (Christensen *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 2010).

En milieu lait supplémenté en casitone (digestion pancréatique des caséines), la population cellulaire finale de la souche CNRZ385 $\Delta$ *pepS* est significativement inférieure à celle obtenue

avec la souche sauvage ce qui suggère que PepS aurait un rôle supplémentaire à celui de la nutrition azotée (Thomas *et al.*, 2010).

La souche CNRZ385 $\Delta$ *pepS* présente par rapport à la souche sauvage un phénotype différent : elle est plus résistante au choc osmotique et au traitement au lysozyme, présente un taux de transformation plus faible et un nombre de coques par de chaînette plus grand (Thomas *et al.*, 2010). Des interrogations existent donc sur le rôle secondaire que pourrait jouer une telle peptidase, avec une activité aussi large, pour expliquer qu'elle affecte autant la croissance ainsi qu'une grande gamme de fonctions de cette bactérie ? Thomas *et al.*, (2010) proposent que cette peptidase aurait un rôle dans la maturation des protéines de ménage ou même la destruction de certaines protéines connues comme étant instables ou ayant une demi-vie courte. En effet, la spécificité de cette peptidase correspond à la séquence de la partie N terminale de ces protéines instables (Fernandez-Esplá et Rul, 1999; Varshavsky, 1996).

- L'aminopeptidase PepA

L'aminopeptidase PepA a une structure octamérique puisque sa masse moléculaire estimée sur gel de filtration est de 360 kDa alors qu'elle est de 45 kDa en électrophorèse SDS PAGE (Rul *et al.*, 1995). PepA montre une activité sur des dérivés para-nitroanilide, les di- et tripeptides et les peptides de grandes tailles comme le fragment 43-58 de la caséine  $\alpha_{S1}$  (Rul *et al.*, 1995).

PepA dégrade préférentiellement les oligopeptides composés de 5 résidus. Elle hydrolyse spécifiquement les peptides possédant à leur extrémité N-terminale des résidus glutamate ou aspartate, elle est capable également de libérer le résidu de sérine présent en position N-terminale (Rul *et al.*, 1995).

Les dipeptides Asp-X préférentiels testés contiennent un résidu aromatique (Tyr ou Phe) en position P'1. PepA représente donc ni une activité endopeptidasique ni une activité carboxypeptidasique sur les peptides testés.

Ces activités peptidasiques spécifiques des acides aminés acides en position N-terminale ont été caractérisées également pour PepA chez *Lc. lactis* MG1363 (l' Anson *et al.*, 1995) et pour PepE chez *E. coli* et *S. typhimurium* (Carter et Miller, 1984).

- La X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase PepX

La peptidase PepX a été plus particulièrement étudiée en raison de sa capacité à hydrolyser les séquences riches en résidus prolyls. En effet, la fraction caséinique qui représente 80% des protéines contient de nombreux résidus prolyl. Ainsi, les caséines  $\alpha_{S1}$ ,  $\alpha_{S2}$ ,  $\beta$ , et  $\kappa$  comportent

respectivement 17, 10, 35, et 20% de résidus prolyl. La capacité de *St. thermophilus* à hydrolyser des peptides issus des caséines est donc primordiale pour son développement en milieu lait.

PepX est une X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase dimérique (Tsakalidou *et al.*, 1997). La spécificité de substrat de cette enzyme a été établie en utilisant différents substrats de synthèse. Elle hydrolyse les substrats ayant une séquence N-terminale X-pro-Y, mais les activités dépendent du type de résidus d'acides aminés X et Y. Sur les peptides testés, PepX a la plus forte activité pour le peptide Gly-Pro-Arg-Pro (Tableau 6).

Un fragment de 4.2 kb contenant le gène *pepX* a été amplifié par PCR et séquencé. L'analyse de la séquence obtenue (4256 pb) a révélé l'existence de deux séquences codantes (CDS) en orientation inverse. CDS1 correspond au gène *pepX* et code une protéine de 755 résidus d'acides aminés avec une masse moléculaire de 85,6 kDa et un point isoélectrique théorique de 5,19. Cette masse moléculaire théorique correspond à la masse moléculaire estimée chez la même souche, en électrophorèse SDS-PAGE (Anastasiou *et al.*, 2002).

**Tableau 6 : Activité relative de l'enzyme PepX de *St. thermophilus* ACA-DC4 sur différents substrats (Tsakalidou *et al.*, 1997)**

Substrats	activité relative (%)
<i>Dérivés de 4-Nitroaniline</i>	
Alanyl-4-nitroanilide	1
Arginyl-4-nitroanilide	2
Arginyl-prolyl-4-nitroanilide	55
Glycyl-phenylalanyl-4-nitroanilide	1
Glycyl-prolyl-4-nitroanilide	100
Leucyl-4-nitroanilide	1
Lysyl-4-nitroanilide	0
Phenylalanyl-4-nitroanilide	7
Prolyl-4-nitroanilide	2
<i>Peptides</i>	
Alanyl-leucyl-alanyl-leucine	0
Alanyl-prolyl-glycine	72
Glycyl-phenylalanine	0
Glycyl-prolyl-arginyl-proline	100
Isoleucyl-prolyl-isoleucine	34
Methionyl-glycine	0
Tyrosyl-alanine	0
Valyl-prolyl-leucine	83

La peptidase PepX présente une identité de 59% avec son homologue de *St. pneumoniae* contre 48% seulement avec celle de *Lc. lactis* ssp. *Lactis* NCDO763 (Anastasiou *et al.*, 2002; Nardi *et al.*, 1991; Tettelin *et al.*, 2001).

## **4. Régulation de l'expression du système protéolytique chez les bactéries**

Les conditions nutritionnelles des bactéries sont susceptibles d'être modifiées brusquement et cela à tout instant. Ces micro-organismes, en modulant et/ou modifiant leur métabolisme, et notamment leur synthèse protéique, sont capables de s'adapter aux variations du milieu extérieur.

### **4.1. Les régulations en réponse à la source de carbone**

Des mécanismes de régulation de la transcription liés à la source de carbone ont été illustrés chez différentes bactéries. L'une d'entre elles, la "répression catabolique", permet le contrôle de l'expression de gènes codant pour des enzymes impliquées dans le métabolisme des glucides et de l'azote (Morel *et al.*, 1999; Stülke et Hillen, 1999; Zomer *et al.*, 2007). La répression catabolique est induite en présence d'une source de carbone rapidement métabolisable telle que le glucose dans le cas de *Lc. Lactis* ou le lactose dans le cas de *St.thermophilus*.

#### **4.1.1. Modèle de la répression catabolique chez les bactéries Gram<sup>+</sup>**

Le régulateur transcriptionnel CcpA (catabolite control protein A), étudié pour la première fois chez *B. subtilis*, joue un rôle essentiel dans la répression catabolique. Ces études ont permis l'élaboration d'un modèle qui se révèle identique chez les bactéries lactiques dont *St. thermophilus* (Van den Bogaard *et al.*, 2002; Luesink *et al.*, 1998; Saier *et al.*, 1996; Stülke et Hillen, 1999). La protéine CcpA appartient à la famille des répresseurs LacI/GalR. Grâce à un motif hélice-tour-hélice, les protéines de cette famille sont capables de se fixer à l'ADN en présence de différents effecteurs (Henkin, 1996). CcpA interagit avec une séquence d'ADN pseudo-palindromique appelée *cre* (catabolite responsive element), dont la séquence consensus chez *B. subtilis* est TGWNANCGNTNWCA (W = A ou T, N = A, T, G ou C) (Weickert et Chambliss, 1990), ou celle identifiée plus tard chez les bactéries à Gram<sup>+</sup> TGNNANCGNTNNCA où une différence de deux nucléotides est autorisée dans toutes les

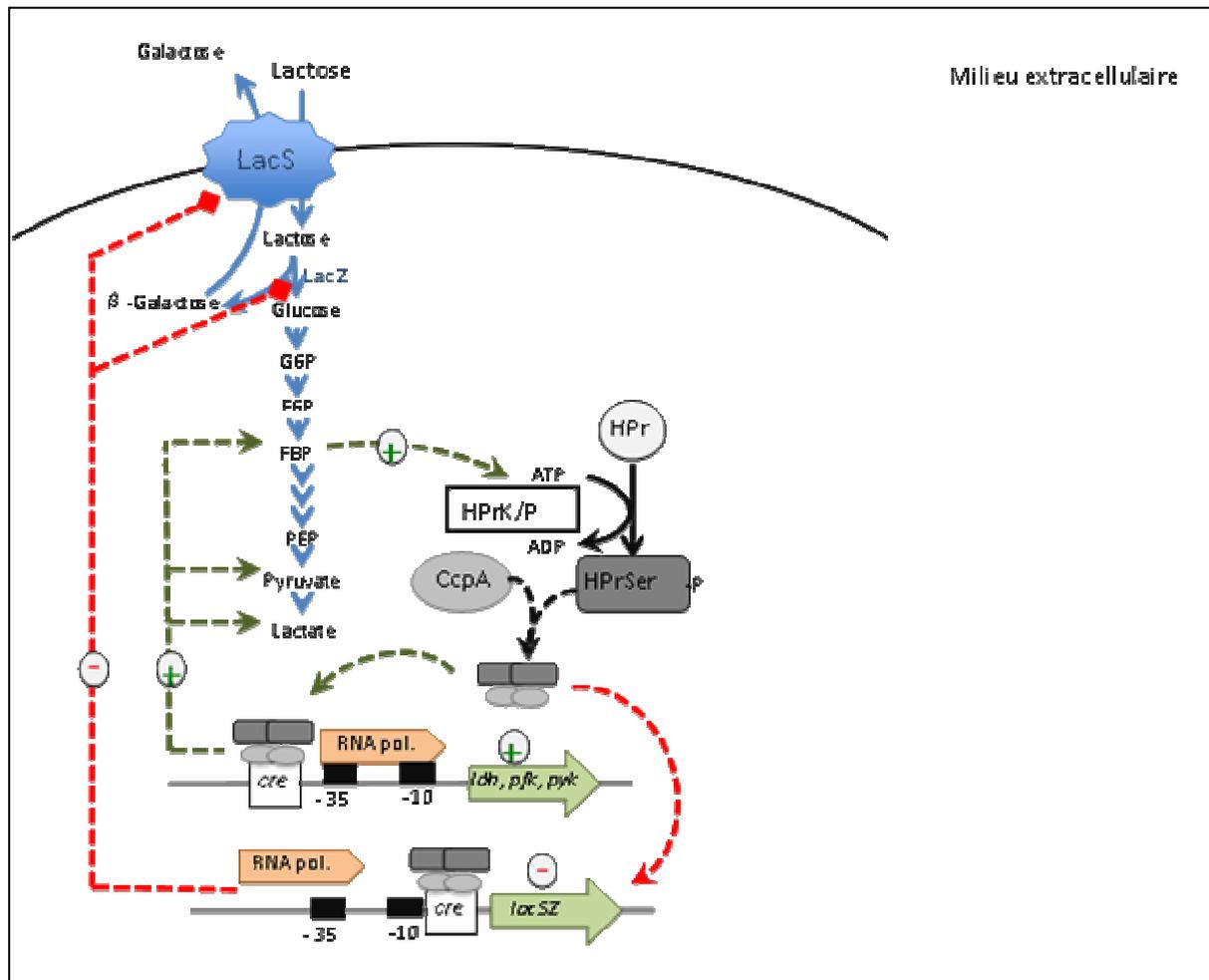
positions sauf pour les deux nucléotides CG présents dans le centre qui doivent être conservés (Hueck *et al.*, 1994). L'interaction entre CcpA et son site de reconnaissance s'effectue en présence d'un co-effecteur qui est la protéine HPr (histidine-containing phosphocarrier protein) dont le résidu séryl en position 46 est phosphorylé (HPr(ser)P). En présence de glucides rapidement métabolisables, la forme HPr(ser)P est privilégiée par rapport à la forme HPr(his)P qui ne peut pas interagir avec le régulateur CcpA. La forme Ser-phosphorylée, permet l'accumulation d'un certain nombre d'intermédiaires glycolytiques (Poncet *et al.*, 2004). Par ailleurs, l'interaction CcpA/*cre* a été étudiée chez *Bacillus megaterium* par Schumacher *et al.*, (2007). En effet, il a été démontré que le fructose-1,6-diphosphate et le glucose-6-phosphate stabilisent directement l'interaction entre CcpA et HPr(ser)P, permettant une régulation fine de l'expression des gènes par CcpA en réponse à l'activité métabolique (Schumacher *et al.*, 2007). Chez *Lc. lactis*, Zomer *et al.*, (2007) ont démontré que la nature de la régulation exercée par CcpA est directement liée au positionnement du site *cre* dans la région promotrice du gène cible. En effet, la présence d'un site *cre* en amont de la région -35 engendre une activation de l'expression du gène cible alors que le positionnement d'un site *cre* au sein ou en aval des régions -35 et -10 du promoteur provoque une répression. Chez *St. thermophilus*, le modèle suivant a été proposé : l'excès de lactose dans le milieu de croissance conduit à l'accumulation de fructose-1,6-bisphosphate (FBP) qui stimule l'activité kinase de l'HPrK/P et donc la production de la HPr(ser)P. Le complexe CcpA- HPr(ser)P se fixe sur le site *cre* provoquant ainsi la répression ou l'activation de la transcription du gène cible selon la position du site *cre* (Figure 9) (Van den Bogaard *et al.*, 2002).

Concernant les gènes régulés par le régulateur CcpA, la plupart des travaux ont reposé sur l'étude de mutants du gène *ccpA*.

Chez *B. subtilis*, une étude a prouvé une induction de l'expression du gène codant l'acétate kinase (*ackA*), et ce via l'intervention coordonnée de CcpA et CodY (Shivers *et al.*, 2006). CodY est un autre régulateur transcriptionnel global, réprimant une partie du métabolisme azoté chez des bactéries Gram<sup>+</sup> à bas pourcentage en bases G et C (Molle *et al.*, 2003).

Chez *Lc. lactis*, Luesink *et al.*, (1998) ont mis en évidence un contrôle négatif par CcpA de l'expression de l'opéron *galAMKTE* qui code des enzymes impliquées dans le catabolisme du galactose, et une activation catabolique de l'opéron *las* (*pfk-pyk-ldh*) (codant pour la phosphofructokinase, la pyruvate kinase et la lactate déshydrogénase respectivement). En effet, la mutation du gène *ccpA* provoque une baisse de l'expression de ces trois derniers gènes

mais aussi une diminution du taux de la croissance de *Lc. lactis* cultivée en présence de glucose, saccharose et fructose (Luesink *et al.*, 1998).



**Figure 9 : Modèle proposé pour l'impact de CcpA sur le métabolisme du lactose chez *St. thermophilus*** (Van den Bogaard *et al.*, 2002)

L'excès de lactose dans le milieu de croissance conduit à l'accumulation de fructose-1,6-bisphosphate (FBP) qui stimule l'activité kinase de l'HprK/P et donc la production de la HPr(ser)P, co-activateur principal de CcpA. Le complexe CcpA- HPr(ser)P se fixe sur le site *cre* provoquant ainsi la répression ou l'activation de la transcription du gène cible selon la position du site *cre*, en aval ou en amont du promoteur.

Chez *St. pneumoniae*, CcpA constitue probablement un régulateur clé du métabolisme central, son rôle s'étendant au contrôle de plusieurs facteurs de virulence (Iyer *et al.*, 2005).

Chez *St. thermophilus* les gènes codant les enzymes de la voie de Leloir et le transport et l'hydrolyse du lactose sont très conservés au sein de cette espèce et forment un cluster *galKTE-galM-lacSZ* composé de deux opérons *galKTE* et *lacSZ* et du gène *galM* (Van den Bogaard *et al.*, 2004, 2000; Ercolini *et al.*, 2005; Hols *et al.*, 2005; Vaughan *et al.*, 2001).

Ces deux opérons sont activés par le régulateur transcriptionnel GalR, codé par le gène *galR* situé en amont du gène *galK* (Vaughan *et al.*, 2001). La mutation du gène *ccpA* de *St. thermophilus* CNRZ302 lève la répression de l'opéron *lacSZ* en présence de lactose (Van den Bogaard *et al.*, 2000). L'expression de ce dernier est aussi induite par l'activateur GalR dans un milieu contenant du glucose ou du galactose (Vaughan *et al.*, 2001). Cette régulation implique la voie de la glycolyse et la voie de Leloir et est aussi associée aux performances du mécanisme de transport du lactose. En excès de lactose, il est remarqué une consommation totale du glucose issu de l'hydrolyse du lactose alors que le galactose n'est consommé que partiellement et secrété dans le milieu extracellulaire, même si la souche est Gal<sup>+</sup>. Par contre, quand le lactose est limitant, ses produits d'hydrolyse (le glucose et le galactose) sont consommés dans les mêmes proportions. Cela résulte de l'action des deux régulateurs GalR et CcpA (Vaughan *et al.*, 2001). Ainsi, CcpA régule le niveau de l'expression de trois enzymes clés dans la voie de la glycolyse. Les niveaux d'expression du gène *ldh* (lactate déhydrogénase) et de l'opéron *las* comportant les gènes *pfk* et *pyk* (phosphofructokinase et pyruvate kinase) sont induits d'une manière CcpA-dépendante en présence de lactose (Figure 9) (Van den Bogaard *et al.*, 2002, 2000).

#### **4.1.2. Régulation des peptidases par la répression catabolique**

Chez les bactéries Gram<sup>+</sup>, le rôle du régulon CcpA ne se limite pas au métabolisme du carbone. CcpA agit également sur l'expression de gènes codant des enzymes clés dans d'autres voies métaboliques, telles que le métabolisme azoté (Hols *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2001; Yoshida *et al.*, 2001).

Chez *Lc. lactis* la source de carbone affecte l'expression de *pepP* (Guédon *et al.*, 2001b). L'expression de ce gène a été étudiée dans des conditions induisant ou non la répression catabolique (MCD-Glc Milieu Chimiquement Défini contenant du glucose vs MCDGal, contenant du galactose). Cette étude suggère fortement que l'expression de ce gène puisse être sous le contrôle de la répression catabolique puisque d'une part sa transcription est significativement augmentée dans les conditions où la répression catabolique n'est pas exercée (MCDGal) : en présence de galactose, le gène *pepP* n'est plus réprimé. D'autre part 4 sites *cre* potentiels ont été détectés en amont du gène *pepP* (Guédon *et al.*, 2001b). Le gène codant la protéine CcpA chez *Lc. lactis* et chez de nombreuses BL est situé en amont du gène *pepQ* avec une orientation tête à tête (Mahr *et al.*, 2000; Zomer *et al.*, 2007). La conservation de cette organisation génétique au sein des BL (*Lb. Bulgaricus*, *Lb. pentosus*, *St. mutans*) suggère un rôle de CcpA dans la régulation de l'expression du gène *pepQ* et peut-être dans

celle d'autres gènes codant des composants du système protéolytique. Zomer *et al.*, (2007) ont proposé que la présence du site *cre* dans la région intergénique *ccpA-pepQ* joue un double rôle chez *Lc. lactis*. Le site *cre* chevauche, d'une part, la boîte -35 du gène *ccpA* gênant ainsi son expression et suggérant une autorégulation du gène *ccpA* (Mahr *et al.*, 2000). D'autre part grâce au même site *cre*, CcpA active directement l'expression du gène *pepQ*, (Mahr *et al.*, 2000). Un des substrats préférentiels de la prolidase PepQ est le dipeptide leucylproline. Ce dipeptide a un effet sur l'expression des gènes *prtP*, *pepC*, *pepN* et sur l'opéron *opp-pepO1* chez *Lc. lactis* (Guédon *et al.*, 2001b). Il a été démontré que le résidu leucine améliore la fixation du régulateur CodY sur son opérateur (den Hengst *et al.*, 2005b). PepQ pourrait donc jouer un rôle dans la régulation du système protéolytique de *Lc. lactis* via son produit d'hydrolyse. Cela suggère qu'il existe chez les BL un couplage entre le métabolisme azoté et le métabolisme carboné. Cette régulation de PepQ par CcpA a été proposée chez la plupart des BL (Zomer *et al.*, 2007).

Chez *Lb. delbrueckii ssp bulgaricus* CNRZ397, le gène homologue de *ccpA* (*pepR1*) est trouvé en amont du gène *pepQ* et un site *cre* est présente dans la région intergénique *ccpA-pepQ*. Contrairement aux autres peptidases PepX, PepIP et PepN, la peptidase PepQ montre une activité deux fois plus importante en milieu riche en peptides (milieu MRS) qu'en lait. La biosynthèse de PepQ dépend donc de la composition du milieu de culture et ne dépend pas de la concentration en peptides. Pour toutes ces raisons, une régulation du gène *pepQ* par CcpA a été proposée (Morel *et al.*, 1999). Une répression catabolique de l'expression du gène *pepQ* a d'ailleurs été mise en évidence chez *Lb. delbrueckii ssp. lactis*. L'activité prolidase de PepQ et l'expression de son gène sont plus élevées quand le glucose est remplacé par du lactose. De plus, la protéine CcpA interagit spécifiquement avec les régions promotrices du gène *pepQ*, des gènes codant deux autres peptidases PepX et PepI et du gène codant un transporteur d'acides aminés ramifiés BrnQ (Schick *et al.*, 1999).

Chez *Lb. pentosus*, le gène *ccpA* a été également retrouvé en amont du gène *pepQ*. Il présente 2 promoteurs, dont le plus éloigné du site d'initiation de la transcription chevauche un site *cre*. Ce promoteur est sous le contrôle de CcpA, suggérant une autorégulation du gène *ccpA* via ce promoteur (Mahr *et al.*, 2000). Chez *Lb. casei*, le gène *ccpA* ne subirait pas d'autorégulation : il est exprimé via un seul promoteur et ne possède pas de site *cre* (Mahr *et al.*, 2000).

Chez *St. thermophilus*, une étude préliminaire a montré que la mutation du gène *ccpA* affecte l'expression de nombreux gènes dont ceux impliqués dans le métabolisme azoté et les co-facteurs du métabolisme (Hols *et al.*, 2005).

## 4.2. Les régulations en réponse à la source d'azote

### 4.2.1. Mécanisme de régulation par des régulateurs généraux en réponse à la source d'azote

En réponse à la concentration d'azote accessible pour les bactéries, les régulations de l'expression de plusieurs composants du système protéolytique d'*E. coli* et de *B. subtilis* ont été caractérisées. Ces régulations impliquent deux régulateurs transcriptionnels pléiotropes : Lrp (Leucline-Responsive regulatory Protein) et CodY (Control Of Dpp). Dans ce paragraphe, nous allons nous intéresser, plus particulièrement, à ces deux régulateurs, à leur mode d'action, aux gènes qu'ils contrôlent, ainsi qu'à leur rôle physiologique pour la cellule.

Le régulateur Lrp a été étudié essentiellement chez *E. coli* et a servi de modèle d'étude chez les bactéries à Gram<sup>+</sup>. Il est décrit comme un régulateur dépendant de la leucine. Lrp appartient à la famille Lrp/AsnC et est très conservée chez les  $\gamma$ -protéobactéries (Brinkman *et al.*, 2003). Ce régulateur se retrouve chez de nombreuses bactéries Gram<sup>-</sup> et des homologues de Lrp sont présents chez certaines bactéries Gram<sup>+</sup> (Belitsky *et al.*, 1997; Beloin *et al.*, 2000; López-Torrejón *et al.*, 2006). L'analyse des séquences de plusieurs génomes a révélé non seulement la présence des gènes codant des protéines de la famille Lrp/AsnC dans les archéobactéries et les eubactéries à Gram<sup>+</sup>, mais aussi une multiplicité surprenante de ces gènes dans le génome de *B. subtilis*. En effet, sept gènes codant des protéines de la famille Lrp/AsnC ont été détectés par BLAST : *lrpC*, *lrpA* (yddO), *lrpB* (yddP), *yezC*, *ywrC*, *azIB* et *yugG* (Beloin *et al.*, 2000).

Le second régulateur, CodY, est un régulateur transcriptionnel présent dans plusieurs espèces de bactéries à Gram<sup>+</sup> aux génomes à bas pourcentage en bases G et C. Il réprime la transcription d'une dizaine de gènes en réponse à la richesse du milieu en acides aminés ramifiés et/ou GTP (Guédon *et al.*, 2001a, 2001b; den Hengst *et al.*, 2005a, 2005b; Serror et Sonenshein, 1996).

Grâce à leur motif hélice-tour-hélice (HTH), les deux protéines Lrp et CodY sont capables de se fixer à l'ADN et réguler des gènes et des opérons de manière directe (Platko et Calvo, 1993; Serror et Sonenshein, 1996). Plusieurs séquences nucléotidiques des opérateurs, sur lesquels Lrp et CodY se fixent, ont été proposées. Concernant la protéine Lrp, des sites consensus de fixation ont été identifiés pour cette protéine (Cui *et al.*, 1995; Rex *et al.*, 1991; Wang et Calvo, 1993a). Ces séquences d'ADN correspondent à des régions riches en bases A et T qui sont généralement des endroits courbés de l'ADN (Gazeau *et al.*, 1994). Chez *Lc. lactis* et *B. subtilis*, des régions d'ADN riches en AT sont également présumées être

reconnues par la protéine CodY pour laquelle deux motifs consensus de fixation ont été proposés (Belitsky et Sonenshein, 2008; den Hengst *et al.*, 2005b; Preis *et al.*, 2009; Serror et Sonenshein, 1996). En fait, les protéines Lrp et CodY, pourraient avoir une affinité à une structure particulière de l'ADN qui ne résulte pas forcément d'une séquence spécifique de ce dernier (Gazeau *et al.*, 1994; Serror et Sonenshein, 1996). Ainsi, chez *E. coli* et *S. typhimurium* plusieurs sites de fixation de Lrp ont été identifiés pour certains opérons du régulon Lrp (Ferrario *et al.*, 1995; Gazeau *et al.*, 1994; Roesch et Blomfield, 1998; Wang et Calvo, 1993a, 1993b; van der Woude *et al.*, 1995; Zhi *et al.*, 1999). L'étude de la fixation de la protéine Lrp sur les différents sites de l'opéron *ilvIH*, qui code une enzyme impliquée dans la biosynthèse des acides aminés ramifiés, a montré chez *E. coli* que la courbure de l'ADN augmente avec le nombre de molécules de protéines Lrp fixées (Wang et Calvo, 1993b). De plus, chez *E. coli* la protéine Lrp se trouve sous deux formes, octamérique ou hexadécamérique (Chen *et al.*, 2001). La transition entre les deux formes pourrait être modulée par la leucine, affectant la liaison et l'activité de la protéine Lrp pour ses gènes cibles (Chen et Calvo, 2002). Ainsi, en présence de la leucine, la forme octamérique est favorisée. La structure de la protéine Lrp en forme octamérique liée à l'ADN a été réalisée chez *E. coli* (de los Rios et Perona, 2007).

#### 4.2.1.1. La régulation par Lrp

##### 4.2.1.1.1. Le régulon Lrp

La protéine Lrp est considérée comme un régulateur général d'*E. coli* puisque l'expression de 5 à 10% des gènes est affectée dans une souche où le gène *lrp* est muté (Newman et Lin, 1995). Les gènes régulés par Lrp sont impliqués dans la biosynthèse, la dégradation et le transport des acides aminés mais aussi dans le transport des nutriments et l'adhérence à l'hôte (Brinkman *et al.*, 2003; Calvo et Matthews, 1994; Ernsting *et al.*, 1992; Newman et Lin, 1995). De plus, la protéine Lrp régule 75% des gènes induits lors du passage en phase stationnaire (Cho *et al.*, 2008; Tani *et al.*, 2002). Dans certains cas, Lrp est un activateur de la transcription comme c'est le cas de l'opéron *ilvIH*, dans d'autres cas c'est un répresseur comme c'est le cas du transporteur des peptides Opp et le transporteur des acides aminés ramifiés (Calvo et Matthews, 1994; Haney *et al.*, 1992). De plus, il a été montré que l'expression de certains gènes pouvait être à la fois induite et réprimée par Lrp (Nou *et al.*, 1995; Zhi *et al.*, 1999). Zhi *et al.*, (1999) ont identifié 11 sites de fixations de la protéine Lrp dans les 350 bp présents en amont de l'opéron *dadAX*, et montré que le positionnement de ces

sites au niveau de la région promotrice détermine directement la nature de la régulation. En effet, il a été démontré que la présence de ces sites au sein du promoteur engendre une répression, alors que le positionnement en amont de la région promotrice provoque une activation de l'expression de l'opéron étudié. Il a aussi été remarqué que la leucine et l'alanine diminuent l'affinité de la protéine Lrp vers les sites responsables de la répression alors qu'ils ont peu ou pas d'effet sur l'affinité de Lrp vers les sites de l'activation (Zhi *et al.*, 1999).

Chez *B. subtilis*, sur les sept gènes codant des protéines de la famille Lrp/AsnC, 4 seulement ont été étudiés : *lrpA* (yddO), *lrpB* (yddP), *azlB* et *lrpC* (Belitsky *et al.*, 1997; Beloin *et al.*, 1997, 2000; Dartois *et al.*, 1997; López-Torrejón *et al.*, 2006).

- LrpA et LrpB sont impliquées dans la sporulation probablement par la régulation de la transcription du gène *glyA* codant une sérine hydroxyméthyl transférase (SHMT) (Dartois *et al.*, 1997).

- AzlB a été décrite comme un régulateur négatif de l'opéron *azlBCDEF* impliqué dans le transport des acides aminés à chaîne ramifiée (Belitsky *et al.*, 1997).

- Enfin, LrpC joue un rôle dans la sporulation et la régulation du métabolisme des acides aminés et contrairement aux autres membres de la famille Lrp/AsnC, cette protéine est autorégulée positivement (Beloin *et al.*, 1997, 2000). LrpC pourrait aussi être impliquée dans la recombinaison et la réparation de l'ADN (López-Torrejón *et al.*, 2006). Enfin, l'analyse des génomes des BL disponibles dans les banques de données EMBL/GenBank (2003) n'a pas révélé d'homologue de Lrp (Brinkman *et al.*, 2003).

#### 4.2.1.1.2. La modulation de la régulation par Lrp

L'affinité de la protéine Lrp pour ses sites de fixation sur l'ADN est modulée par la leucine qui se fixe par son tour à la protéine Lrp (Calvo et Matthews, 1994; Chen *et al.*, 2001; Ernsting *et al.*, 1992; Lin *et al.*, 1992; Newman et Lin, 1995; Ricca *et al.*, 1989; Roesch et Blomfield, 1998; Willins *et al.*, 1991).

La régulation par Lrp est aussi affectée par la modulation de l'expression de son gène. Un des paramètres susceptibles de faire varier l'expression du gène *lrp* est la protéine Lrp elle-même. En effet, la transcription du gène *lrp* est autorégulée et peut être réprimée par la protéine Lrp elle-même (Chen *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 1994). L'expression du gène *lrp* est aussi affectée par la composition du milieu de croissance. La transcription de ce gène est réprimée dans un milieu riche en acides aminés et affectée aussi par la source de carbone présente dans le milieu (Chen *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1994). Finalement, la

phase de croissance module indirectement la concentration de Lrp dans les cellules et cela indépendamment de la composition du milieu. En fait, l'expression du gène *lrp* est plus importante en phase stationnaire qu'en phase exponentielle de croissance (Landgraf *et al.*, 1996).

#### 4.2.1.2. La régulation par CodY

CodY est un régulateur transcriptionnel pléiotrope particulièrement étudié chez *B. subtilis* et *Lc. lactis*. Il est présent dans plusieurs espèces de bactéries à Gram<sup>+</sup> aux génomes à bas pourcentage en bases G et C (Guédon *et al.*, 2005; Sonenshein, 2005). Le consensus établi chez *Lc. lactis* et confirmé chez *B. subtilis* concernant sa séquence de fixation à l'ADN est AATTTTCWGAAAATT (Belitsky et Sonenshein, 2008; Guédon *et al.*, 2005; den Hengst *et al.*, 2005b).

##### 4.2.1.2.1. Le régulon CodY

Le régulon CodY comprend les gènes identifiés comme étant régulés par CodY. Chez *B. subtilis*, CodY réprime significativement plus de 100 gènes pendant la phase exponentielle de croissance. Ces gènes sont impliqués dans différentes voies métaboliques et fonctions cellulaires comme des protéines impliquées dans le métabolisme de l'azote (*ureABC*, *dpp*, *hut*, *bkd*, et *gabP*), de l'acétate (*acsA*), dans le développement de la compétence (*rapC*, *srfA* et *comK*) ou encore la synthèse des acides aminés branchés (Fisher, 1999; Serror et Sonenshein, 1996).

Il existe deux exceptions pour lesquelles CodY est connu pour être activateur : la première concerne le gène *bsrF* et la deuxième le gène *ackA* (acétate kinase) dont la régulation fait également intervenir CcpA (Preis *et al.*, 2009; Shivers *et al.*, 2006). Cette coopération entre ces deux régulateurs n'est d'ailleurs pas le seul exemple chez *B. subtilis*, puisqu'elle existe aussi au niveau de l'opéron *ilv-leu* codant des enzymes impliquées dans la synthèse des acides aminés branchés. CcpA y joue le rôle d'activateur alors que CodY est répresseur (Tojo *et al.*, 2005).

CodY active directement la transcription des gènes *bsrF* et *ackA* en se fixant en amont du site d'initiation de la transcription des deux gènes, respectivement à -329 pb et entre -61 et -100 pb (Preis *et al.*, 2009; Shivers *et al.*, 2006). Ces deux positions correspondent à des modèles classiques de régulation positive. La protéine CodY se fixe mais avec une faible affinité à un deuxième site dans la région promotrice du gène *ackA*, ce site chevauchant la boîte -10 et le

site d'initiation de la transcription, ce qui est inhabituel pour un régulateur positif (Shivers *et al.*, 2006). Les centres des deux régions affines pour la protéine CodY sont distants de 77 pb, suggérant que les molécules CodY liées seraient sur la même face de l'hélice d'ADN. Pour expliquer cette situation, l'auteur propose que CodY et l'ARN polymérase se lient à l'hélice d'ADN face à face. Ainsi, soit CodY stabilise la fixation de l'ARN polymérase, soit CodY modifie la structure de la région promotrice afin de faciliter la fusion de l'ADN (Shivers *et al.*, 2006).

L'analyse du régulon CodY chez *Lc. lactis* montre beaucoup de similarités avec celui de *B. subtilis*, les différences étant particulièrement attachées aux propriétés physiologiques de chacune des deux bactéries. Le régulon CodY de *Lc. lactis* comporte une centaine de gènes selon les résultats des études de Guédon *et al.* (2001ab, 2005) et den Hengst *et al.* (2005b). L'opéron *ilv* constitue, comme pour *B. subtilis*, une cible privilégiée ainsi que des gènes codant des protéines impliquées dans les voies de biosynthèse d'autres acides aminés, le transport des peptides ou des acides aminés, dont le gène *bcaP* qui code un transporteur des BCAA (Guédon *et al.*, 2005; den Hengst *et al.*, 2006, 2005b). Guédon *et al.*, (2001b) ont montré que l'expression de six gènes ou groupes de gènes (*prtP*, *opp-pepO<sub>1</sub>*, *pepN*, *pepC* et *pepX*) est réprimée de 5 à 150 fois suite à l'ajout d'un hydrolysats contenant 80% de peptides et 20% d'acides aminés alors que celle de 9 autres testés (*dtpT*, *pepP*, *pepA*, *pepF2*, *pepDAI*, *pepQ*, *pepT*, *pepM* et l'opéron *dtpP*) n'est pas affectée. Donc, certaines protéines faisant partie de la machinerie protéolytique semblent ne pas être régulées par CodY, comme c'est le cas de PepA, PepQ et DtpT. Par ailleurs, comme cela a été évoqué précédemment, la source de carbone affecte l'expression de *pepP* chez *Lc. lactis* (Guédon *et al.*, 2001b).

Chez les streptocoques, CodY constitue également un régulateur clé surtout chez les streptocoques pathogènes où le rôle de CodY s'étend au contrôle de plusieurs facteurs de virulence.

Chez *St. pneumoniae*, Hendriksen *et al.*, (2008) ont montré l'implication de CodY dans la répression de l'opéron *ilvBNC*, ainsi que le gène *gdhA* codant une glutamate déshydrogénase. Ce régulon est composé principalement de gènes impliqués dans le métabolisme des acides aminés, mais aussi dans d'autres processus cellulaires, tels que le métabolisme du carbone et l'absorption du fer (Hendriksen *et al.*, 2008). Contrairement à *B. subtilis*, aucun des gènes impliqués directement dans la compétence ne semble être sous le contrôle de CodY (Hendriksen *et al.*, 2008). Il est par ailleurs suggéré que CodY serait directement ou indirectement engagé dans la pathogénicité du pneumocoque, en accord avec

son implication dans la réponse à des changements nutritionnels. Hendriksen *et al.*, (2008) suggèrent un lien possible entre la régulation nutritionnelle et l'adhérence puisque l'expression du gène codant la protéine de liaison à la choline PcpA est réprimée dans un mutant *codY* (gène interrompu par un remplacement d'allèle). De plus, la protéine CodY est capable de se fixer en amont du gène *pcpA*. De plus, chez un double mutant *codY pcpA*, l'adhérence est encore plus diminuée par rapport au simple mutant *codY*. En effet, chez un mutant *codY*, seule une transcription de base du gène *pcpA* est présente, permettant une faible adhésion du pneumocoque par rapport à celle du type sauvage. Ainsi, dans les modèles expérimentaux murins, colonisés au niveau du nasopharynx et des poumons par *St. pneumoniae*, Hendriksen *et al.*, (2008) ont démontré que le gène *codY* est transcrit. CodY semble donc nécessaire pour la colonisation. Ce constat a été renforcé *in vitro* par la diminution de l'aptitude du mutant *codY* à adhérer à des cellules du nasopharynx (Hendriksen *et al.*, 2008).

Chez *St. pyogenes*, l'étude de l'expression des gènes codant des enzymes métaboliques, des facteurs de transcription, des transporteurs et des facteurs de virulence a été menée. Il a été montré que l'expression de plusieurs gènes de chacun des quatre groupes étudiés est soumise à un contrôle direct ou indirect par CodY en fonction de l'état nutritionnel (Malke *et al.*, 2006a, 2006b). Par exemple, le gène *braB* impliqué dans le transport des BCAA constitue une cible privilégiée de la protéine CodY chez *St. pyogenes* (Malke *et al.*, 2006b). Chez cette bactérie, la voie de biosynthèse des BCAA est absente et cette bactérie est donc dépendante des systèmes de transport d'oligopeptides et de BCAA (Ferretti *et al.*, 2001). De plus, CodY est impliqué dans une régulation transcriptionnelle positive de *pellsagA* et *mga* selon la phase de croissance. Ces gènes codent des régulateurs qui affectent positivement l'expression de plusieurs facteurs de virulence (Malke *et al.*, 2006b). Dans un milieu complexe, CodY joue un rôle dans l'activation des gènes de virulence en milieu de phase exponentielle. Dans ces conditions, CodY renforce la transcription de l'activateur pléiotrope *mga*, simultanément avec une forte régulation positive d'au moins 6 facteurs de virulence (*hasA*, *ideS*, *speH*, *scpA*, *prtS* et *scl*) (Malke *et al.*, 2006b). Parmi ceux-ci, *scpA* et *scl* sont connus comme des cibles de l'activateur *mga* (McIver et Scott, 1997; McLandsborough et Cleary, 1995; Rasmussen *et al.*, 2000). De même, les autres facteurs de virulence notamment PrtS (protéase homologue à celle de *St. thermophilus* avec un pourcentage d'identité de 32%) sont soumis à une forte régulation positive et ne font pas partie du régulon Mga. De plus, contrairement à la situation chez *B. subtilis* et *Lc. lactis* (den Hengst *et al.*, 2005b; Molle *et al.*, 2003; Serror et Sonenshein, 1996), en milieu MCD et en milieu riche, l'expression de

*dppA* chez *St. pyogenes* est fortement activée en milieu de phase exponentielle par CodY. Ce résultat suggère que CodY pourrait activer l'expression de certains gènes d'une manière directe (Malke *et al.*, 2006b).

Pour ce qui concerne *St. thermophilus*, l'analyse de la séquence du génome de trois souches disponible dans les banques de données indique la présence d'un homologue de CodY. *In vitro*, des expériences de retard sur gel ont montré que la protéine CodY de *St. thermophilus* est capable de se fixer sur les promoteurs de 14 gènes appartenant au système protéolytique (*prtS*, *amiA1*, *pepA*, *pepS*, *pepN*, *pepC*, *pepB*, *pepQ*, *pepV*, *pepT*, *pepM*, *pepXP*, *pepP* et *pepO*) ce qui suggère que CodY de *St. thermophilus* pourrait jouer un rôle similaire à son homologue de *Lc. lactis* (Liu *et al.*, 2009).

#### 4.2.1.2.2. Les signaux dans la régulation par CodY

Très peu d'études étant disponibles sur le régulateur CodY chez *St. thermophilus*, le modèle proposé chez d'autres bactéries essentiellement *B. subtilis* et *Lc. lactis* sera discuté dans ce paragraphe.

L'absence de région hydrophobe dans CodY suggère que la protéine est probablement cytoplasmique et répond à un signal intracellulaire (Slack *et al.*, 1995). Chez *Lc. lactis*, ce résultat a été confirmé par Guédon *et al.* (2001a) qui ont montré que les dipeptides contenant un des 3 acides aminés branchés doivent entrer dans la cellule pour qu'ils exercent, via CodY, leur effet répresseur sur la transcription des gènes cibles. Comme pour le régulateur Lrp, la régulation par CodY pourrait être modulée par la concentration de la protéine CodY elle-même. Chez *B. subtilis*, CodY est plus exprimée durant la phase exponentielle de croissance que durant la phase stationnaire (Slack *et al.*, 1995). En fait, Fisher *et al.* (1996) supposent que l'effecteur de la régulation par CodY chez *B. subtilis* pourrait être une molécule produite en réponse à différents paramètres comme la vitesse de croissance plutôt que à la composition du milieu de croissance.

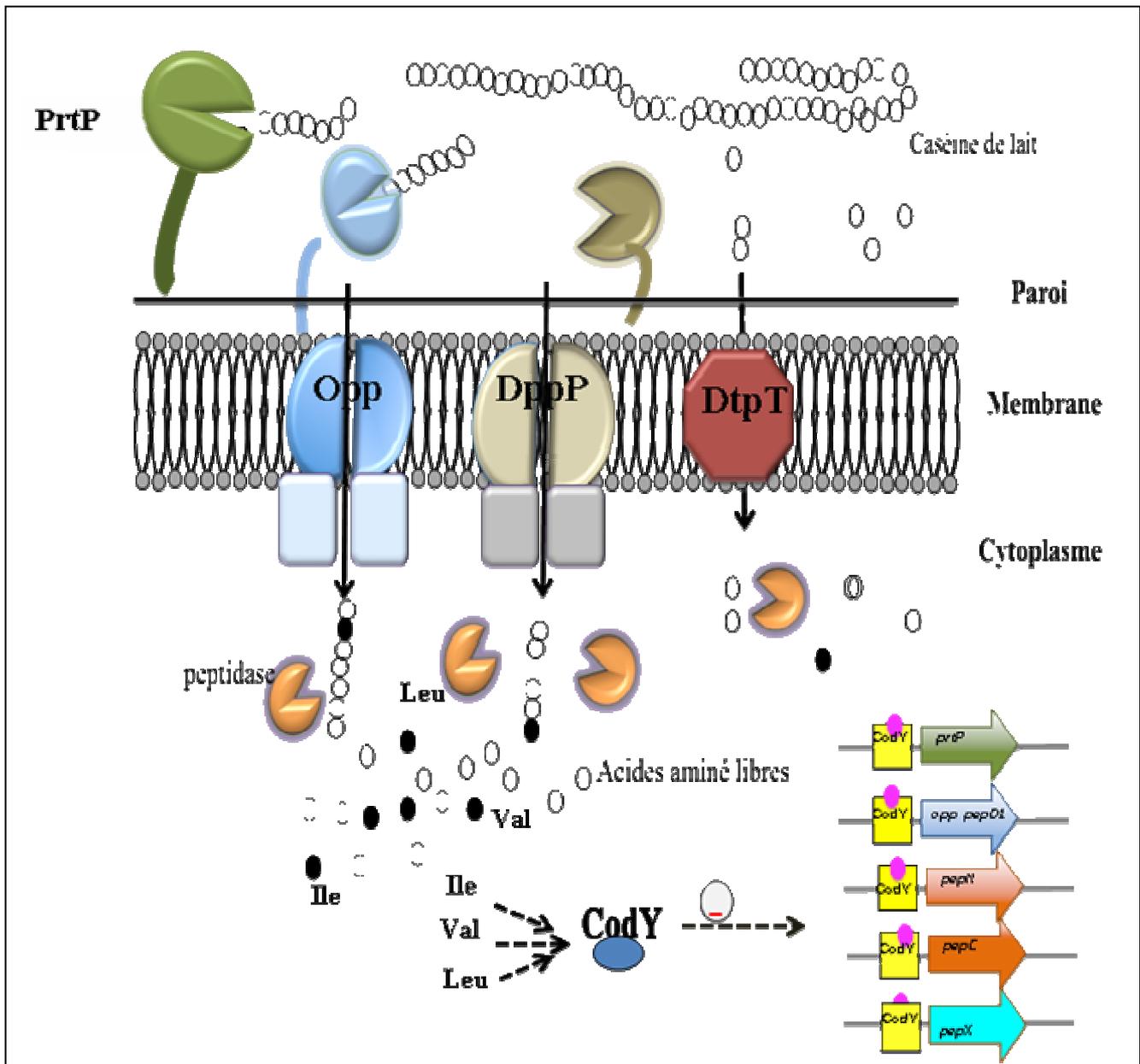
Dernièrement, plusieurs études fonctionnelles chez *B. subtilis* ont montré que cette protéine réprime les gènes de son régulon en présence de deux effecteurs, le GTP et/ou les BCAA indépendamment (Ratnayake-Lecamwasam *et al.*, 2001; Shivers et Sonenshein, 2004). Dans les deux cas où codY est connu pour être un activateur (*ackA* et *bsrF*), son rôle semble être plus compliqué. Pour activer le gène *bsrF*, CodY a besoin des deux effecteurs GTP et BCAA et l'effet du GTP nécessite la présence des BCAA alors que dans le cas du gène *ackA*, il a besoin essentiellement des BCAA pour activer l'expression (Preis *et al.*, 2009; Shivers *et al.*, 2006). Cette activation est supplémentée par CcpA qui joue un double rôle : d'une part il

active l'expression du gène *ackA* indépendamment de CodY, et d'autre part il active la protéine CodY en activant l'expression de l'opéron *ilvB* (Shivers et Sonenshein, 2005; Tojo *et al.*, 2005). L'opéron *ilvB* est impliqué dans la biosynthèse des BCAA et réprimé par CodY (Fink, 1993).

Chez *Lc. lactis*, les BCAA sont les seuls effecteurs intracellulaires connus capables d'activer la répression par CodY sachant que la plupart des souches de *Lc. lactis* sont auxotrophes pour les BCAA (Figure 10) (Guédon *et al.*, 2005; den Hengst *et al.*, 2005a; Petranovic *et al.*, 2004). Des expériences *in vitro* ont montré que plusieurs molécules de CodY se fixent sur le promoteur de l'opéron *opp* et le nombre de ces molécules est affecté par la quantité des acides aminés branchés qui stimulent cet accrochage (den Hengst *et al.*, 2005a). En effet, chez *Lc. lactis* les acides aminés branchés, surtout l'isoleucine, augmentent fortement l'affinité de CodY pour les promoteurs des gènes qu'il contrôle alors que le GTP n'a pas d'effet (Guédon *et al.*, 2005; den Hengst *et al.*, 2005a; Petranovic *et al.*, 2004). Étant donné que le GTP est un marqueur de l'état énergétique de la cellule et qu'il a un effet modulateur de l'activité de CodY de *B. subtilis*, cela pourrait soutenir la possibilité que CodY de *B. subtilis* est sensible à l'état énergétique de la cellule, contrairement à son homologue de *Lc. lactis*, d'où la présence de gènes du métabolisme carboné dans le régulon CodY de *B. subtilis* (den Hengst *et al.*, 2005a).

Chez *St. pneumoniae*, malgré la présence des gènes du métabolisme carboné dans le régulon CodY, la fixation de ce dernier à l'ADN est modulée par la présence des BCAA et non par le GTP (Hendriksen *et al.*, 2008).

Hendriksen *et al.*, (2008) ont identifié une boîte CodY chez *St. pneumoniae*, qui est semblable à la séquence consensus décrite chez *Lc. lactis*. Ainsi, ils ont montré que la plupart des gènes surexprimés dans un mutant *codY* (gène inactivé) sont sous le contrôle direct de CodY, et que ce dernier n'a pas la même affinité pour tous les promoteurs de son régulon. D'une part, l'affinité de CodY pour son propre promoteur est relativement faible en présence de faible concentration de BCAA, mais avec une concentration élevée de BCAA, cette affinité augmente largement et CodY pourrait réprimer fortement sa propre expression. D'autre part, l'affinité globale de CodY pour la région promotrice du gène *gdhA* (qui code une glutamate deshydrogénase) est beaucoup plus élevée que celle du gène *codY*, ce qui indique que, même à de très faibles concentrations de BCAA, CodY pourrait encore réprimer l'expression du gène *gdhA* (Hendriksen *et al.*, 2008).



**Figure 10 : Modèle présentant la régulation de l'expression de certains gènes du régulon protéolytique de *Lc. lactis* (Guédon *et al.*, 2001a, 2001b)**

Enfin, chez *St. pyogenes*, la répression du gène *braB* qui dépend de CodY, est largement atténuée en situation d'abondance de BCAA et d'absence des autres acides aminés, alors que chez *B. subtilis* la répression de l'opéron *ilvB*, également dépendante de CodY, a lieu dans un milieu complexe et milieu minimal contenant BCAA (Malke *et al.*, 2006b; Molle *et al.*, 2003).

Nous venons de voir que CodY participe à la régulation du métabolisme azoté dans plusieurs espèces de bactéries à Gram<sup>+</sup>. Il permet ainsi à la bactérie d'adapter son métabolisme à la quantité et aux types de nutriments présents dans son environnement. D'autres régulateurs de transcription (TnrA et GlnR) sont impliqués chez *B. subtilis* dans la modulation de ce métabolisme selon des conditions du milieu (Fisher, 1999). Ces deux régulateurs appartiennent à la famille MerR et reconnaissent le même opérateur avec la séquence TGTNANTNACA (Fisher, 1999; Kloosterman *et al.*, 2006). A ce jour, il n'a pas été prouvé que l'expression des gènes codant les composants du système protéolytique de *B. subtilis* ou d'autres bactéries à Gram<sup>+</sup> soit régulée d'une manière directe par un de ces régulateurs.

#### **4.2.2. Régulation des composants du système protéolytique de *St. thermophilus***

Si la régulation du système protéolytique des bactéries modèles *Lc. lactis* et *B. subtilis* a été relativement bien décrite, elle a été très peu étudiée chez *St. thermophilus*.

Quelques études protéomiques sur *St. thermophilus* ont été réalisées. Nous pouvons citer l'étude faite par Arena *et al.*, (2006). Cette étude a comparé le profil protéique obtenu en M17-lactose, avec ceux obtenus après différents stress (froid, chaud, oxydant, acide et carence nutritionnelle). Les résultats montrent que *St. thermophilus* répond aux différents stress par l'augmentation de la quantité des protéines de stress général, mais aussi l'augmentation de la quantité des protéines spécifiques à chacune des conditions (Arena *et al.*, 2006).

Une autre étude sur l'adaptation au lait a été effectuée chez *St. thermophilus* LMG18311. Le profil protéomique de la bactérie a été comparé dans deux milieux : M17-lactose et lait. Il a été mis en évidence notamment le rôle de la pyruvate formiate lyase (Pfl) dans l'adaptation de *St. thermophilus* au lait, milieu dans laquelle elle est fortement induite (Derzelle *et al.*, 2005). La pyruvate formiate lyase (Pfl) catalyse le clivage non oxydatif du pyruvate en formiate et en acétyl-CoA selon un mécanisme radicalaire (Knappe et Sawers, 1990). Le formiate produit est probablement impliqué dans la biosynthèse des purines. Chez *St. bovis*, l'expression du gène *pfl* dépend de la source de carbone métabolisable par un mécanisme dépendant de CcpA (Asanuma et Hino, 2000; Asanuma *et al.*, 2004). Chez la souche LMG18311, une séquence *cre* a été détectée en amont du gène *pfl* (la séquence TGTAAGCGGTTACT se situe à -92 pb du potentiel codon start ATG), ce qui suggère que la source de carbone modulerait aussi l'expression du gène *pfl* chez *St. thermophilus* (Derzelle *et al.*, 2005). Derzelle *et al.*, (2005) ont aussi montré que BcaT et IlvC sont produites à des niveaux plus élevés pendant la croissance en lait. Ainsi, plusieurs peptidases ont été identifiées par 2-DE (PepC, PepN, PepQ, PepX), et seulement une d'entre elles, la X-prolyl-

dipeptidyl aminopeptidase PepX, subit une régulation positive au cours de la croissance dans le lait. Ceci est en contraste avec la situation constatée chez *Lc. lactis*, où *pepX*, *pepC* et *pepN* appartiennent au même régulon (Derzelle *et al.*, 2005). Dans le cas de la peptidase PepN, l'effet du milieu sur son activité a été déjà mentionné chez la souche *St. thermophilus* A. Cette peptidase garde seulement 49% de son activité quand les peptides utilisés comme source d'azote sont remplacés par une quantité équivalente d'acides aminés (Chavagnat *et al.*, 1999). Cette perte d'activité pourrait être expliquée par une répression de l'expression du gène *pepN*, d'autant qu'une séquence répétée inversée a été retrouvée dans la région promotrice de ce gène. Donc la présence de cette séquence avec une structure de type opérateur suggère la présence d'une régulation transcriptionnelle au niveau de l'initiation de la transcription (Chavagnat *et al.*, 1999).

De plus, une analyse de la physiologie de *St. thermophilus* LMG18311 a été faite par comparaison de la variation d'expression des gènes et de l'abondance protéique en lait entre deux stades de croissance (2,5 h et 5,5 h) (Herve-Jimenez *et al.*, 2008). Cette analyse a mis en évidence la variation de 84 gènes ou protéines de *St. thermophilus* entre 2,5 h et 5,5 h de croissance en lait. La majorité de ces gènes ou protéines sont impliqués dans le métabolisme azoté (51% du total). L'analyse a révélé une régulation positive des transporteurs de peptides et d'acides aminés, notamment au niveau des deux opérons *livJHMGF* et *amiA<sub>1</sub>CDEF* et du gène *dtpT*, des voies spécifiques de biosynthèse des acides aminés, notamment les acides aminés soufrés, et des gènes et protéines impliqués dans le métabolisme de divers sucres (Herve-Jimenez *et al.*, 2008). De plus, l'approche protéomique a révélé que l'expression de 27 protéines variait significativement entre les 2 stades de croissance en lait. L'expression de 13 protéines dont la peptidase PepX était réprimée. L'expression de cette peptidase est réprimée au niveau protéomique puisqu'elle reste stable au niveau transcriptomique (Herve-Jimenez *et al.*, 2008). Donc, les gènes *pepX*, *dtpT* et les deux opérons *livJHMGF* et *amiA<sub>1</sub>CDEF* n'ont pas le même comportement, sachant néanmoins qu'il pourraient être régulés par CodY puisque Liu *et al.*, (2009) ont montré que CodY est capable de se fixer aux promoteurs de 14 gènes appartenant au système protéolytique de *St. thermophilus* dont le promoteur du gène *pepX* et l'opéron *amiA<sub>1</sub>CDEF*.

- Expression du gène *priS* au cours de la croissance

L'activité de la protéase de paroi de deux souches de *St. thermophilus* (CNRZ 385 et CNRZ 703) a été étudiée dans deux milieux différents : en lait et en milieu M17 (Shahbal *et al.*, 1993). La présence d'une source d'azote disponible immédiatement (milieu M17) affecte

l'activité de la protéase de la souche CNRZ 703, mais pas de celle de la souche CNRZ 385. En effet, aucune différence significative dans l'activité de la protéase n'a été trouvée pour la souche CNRZ 385 lorsque les cellules ont été cultivées en lait et en milieu M17. Au contraire, la souche CNRZ 703 présentait une activité trois fois plus élevée lorsque les cellules étaient cultivées en lait par rapport au milieu M17 (Shahbal *et al.*, 1993). De plus, chez la souche CNRZ385 l'activité est maximale à la fin de la phase exponentielle puis elle diminue rapidement au début de la phase stationnaire alors que chez la souche CNRZ703 la valeur de cette activité est maximale à la fin de la phase exponentielle et elle reste stable au cours de la phase stationnaire (Shahbal *et al.*, 1993). Il apparaît donc que les deux protéases des deux souches CNRZ 385 et CNRZ 703 ne sont pas régulées de la même façon.

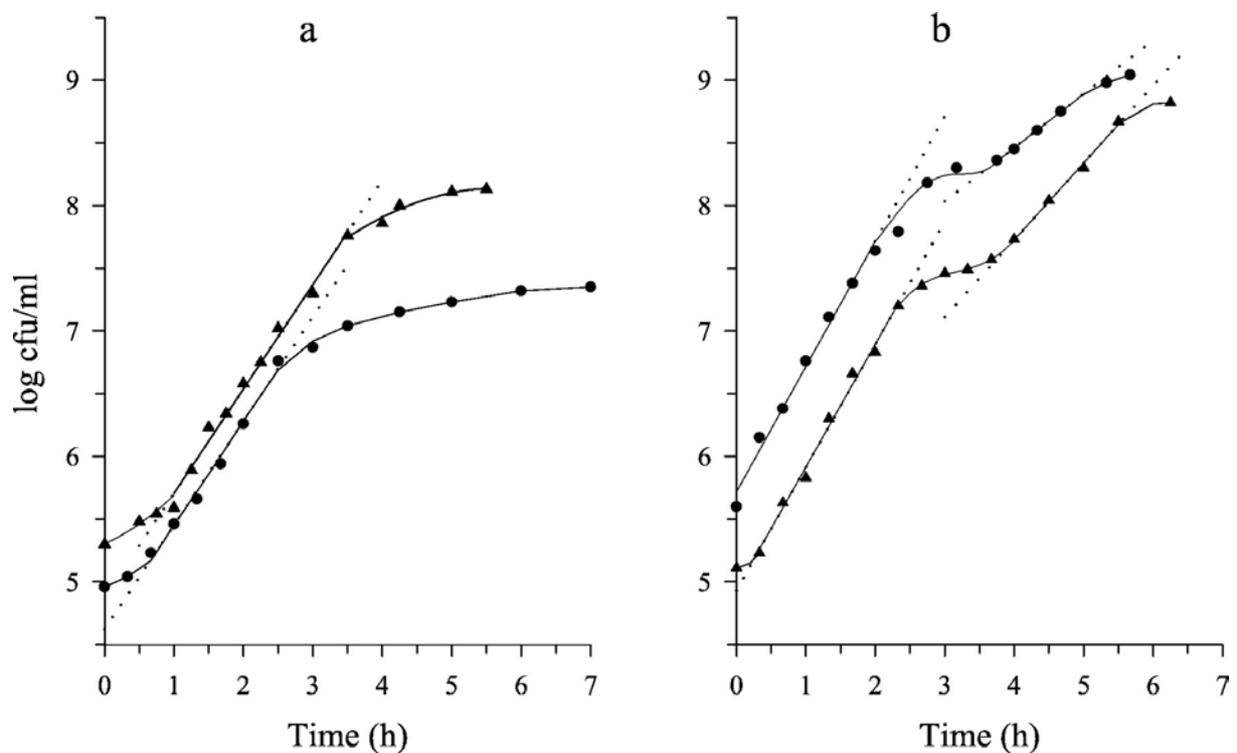
Malgré cette divergence au niveau de la régulation, les deux protéases montrent des profils similaires de dégradation des caséines : les deux caséines  $\alpha_{s1}$  et  $\beta$  sont hydrolysées avec une préférence pour la deuxième (Shahbal *et al.*, 1993).

Des observations similaires ont été faites pour la production de la protéase associée à la paroi dans différentes souches de lactocoques. La protéase de la paroi de *Lc. lactis* ssp. *cremoris* E8 et AM1 et *Lc. lactis* ssp. *lactis* NCDO 763 sont inductibles (Exterkate et de Veer, 1985; Monnet *et al.*, 1987), alors que cette enzyme est constitutive chez *Lc. lactis* ssp. *cremoris* Wg2 (Hugenholtz *et al.*, 1987). Ainsi chez *Lb. helveticus* CRL 1062 et CRL 974 (ATCC 15009), la biosynthèse de la protéase de surface dépend de la concentration des peptides dans le milieu de culture (Hebert *et al.*, 2000). Les niveaux les plus élevés ont été trouvés lors de la croissance cellulaire en MCD mais la synthèse de cette enzyme est inhibée en MCD supplémenté en casitone, casaminoacides ou  $\beta$ -CN (Hebert *et al.*, 2000).

L'étude de la croissance en milieu lait de différentes souches de *St. thermophilus*, possédant ou non PrtS, a révélé que des souches possédant PrtS présentent une croissance diauxique en milieu lait et que PrtS est exprimée au cours de la deuxième phase exponentielle (Figure 11) (Letort *et al.*, 2002). La régulation fine du gène demeure inconnue. Ainsi, durant la première phase exponentielle de croissance *St. thermophilus* utilise les acides aminés libres et les petits peptides du lait alors que pendant la deuxième phase exponentielle de croissance, phase au cours de laquelle PrtS est exprimée, la bactérie peut utiliser les caséines comme source d'acides aminés. Une croissance diauxique dans le lait avec deux phases exponentielles de croissance est également démontrée chez d'autres bactéries capables de se développer dans le lait telles que *S. aureus*. Pendant la phase de transition se produit la coagulation du lait. La coagulation semble être provoquée par l'activité protéolytique des enzymes sécrétées par *S. aureus*, qui produit 10 protéases extracellulaires : les protéases

ScpA, SplA, B, C, D, E, et F, SspA et B, et la métalloprotéase Aur (Borezée-Durant *et al.*, 2009).

Malgré le rôle important que joue la protéase PrtS dans le développement de *St. thermophilus* dans le lait, les souches qui en sont dépourvues peuvent néanmoins s'y développer. En effet, elles sont souvent cultivées avec d'autres bactéries lactiques telle que *Lb. bulgaricus* qui peuvent hydrolyser les protéines laitières et fournir à *St. thermophilus* les peptides nécessaires à sa croissance (Courtin *et al.*, 2002).



**Figure 11 : Croissance en milieu lait d'une souche de *St. thermophilus* ne comportant pas (a) ou comportant (b) à sa surface la protéase PrtS (Letort *et al.*, 2002)**

## **II. Objectifs du travail**

## Objectif du travail

L'équipe « Proteolyse et Biofonctionnalités des Protéines et Peptides » s'intéresse aux peptides bioactifs issus des protéines laitières. Ses recherches concernent (i) la production de peptides bioactifs à partir des protéines laitières et (ii) la compréhension de la biodisponibilité/mode d'action de peptides bioactifs modèles, isolés par l'équipe antérieurement. Concernant la production de peptides bioactifs, l'équipe PB2P a exploré ces dernières années la possibilité de libérer des peptides bioactifs à partir des lactoprotéines en utilisant le système protéolytique de surface de *St. thermophilus*. Dans ce cadre, les objectifs de ma thèse ont été d'étudier la variabilité du système protéolytique de surface au sein de l'espèce *St. thermophilus*, en me focalisant plus particulièrement sur la variabilité de la protéase de paroi PrtS. Dans ce manuscrit les différents résultats obtenus sont organisés en 3 chapitres dont deux ont fait l'objet d'une publication parue ou en cours de révision. Ces deux publications sont incluses. Les résultats du troisième chapitre n'ayant pas encore été publiés, ils sont présentés in extenso et discutés.

## **III. Matériels et Méthodes**

# 1. Souches, milieux et conditions de culture

## 1.1. Souches bactériennes utilisées et conditions de conservation

Les souches de *St. thermophilus* étudiées font partie d'une collection du laboratoire. Ces souches d'origines diverses proviennent soit d'isolements réalisés au laboratoire à partir de produits laitiers d'origines différentes (ferments, yaourts ou fromages à pâtes pressées cuites) (P. Bracquart, communication personnelle) soit de la collection CNRZ (Centre National de Recherches Zootechniques, INRA Jouy-en-Josas, France) soit de la collection ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) (Tableau 7). Ces souches sont stockées au laboratoire à - 80°C en lait écrémé reconstitué à 10% (m/v).

**Tableau 7 : Origine des souches de *St. thermophilus* utilisées dans ce travail**

Souches	Origine	Souches	Origine
CNRZ21	Yaourt	CNRZ308	Fromage
CNRZ307	Fromage	CNRZ302	Fromage
CNRZ1066*	Yaourt	ATCC19258	Lait pasteurisé
PB180	Fromage	ST85	Fromage
ATE11PB6	Yaourt	ST80	Fromage
ST19	Yaourt	ST88	Fromage
PB5	Yaourt	ATE19PB8	Yaourt
HAD8 $\alpha$	Yaourt	ST87	Fromage
CNRZ445	Fromage	PB18	Fromage
ST20	Yaourt	Y4	Yaourt
CNRZ160	Yaourt	LMD-9*	Yaourt
ST14	Yaourt	4F44	Fromage
CNRZ407	Yaourt	PB302	Yaourt
CNRZ404	Yaourt	PB385	Yaourt
HAD17	Yaourt	CNRZ391	Yaourt

## 1.2. Milieux et conditions de culture

Les cultures ont été incubées pendant une nuit en lait écrémé à 42°C avant chaque expérience (Tableau 8). Pour l'extraction d'ADN et les mesures d'activité enzymatique (protéase ou uréase), les souches ont été cultivées à 1% (v/v) dans le milieu M17 (Tableau 8) (Terzaghi et Sandine, 1975) avec ou sans urée (0,1% m/v). Pour le suivi de l'acidification, les souches de

*St. thermophilus* ont été cultivées en lait écrémé reconstitué à 10% (m/v) avec ou sans bactotryptone à 1% (m/v) et avec ou sans fluorofamide (N-[diaminophosphinyl]-4-fluorobenzamide; ICN, Orsay, France) (10 µM) qui est un inhibiteur de l'uréase (Pernoud *et al.*, 2004).

**Tableau 8 : Composition des milieux de culture utilisés**

Milieu	Composition		Utilisation
Lait reconstitué à 10% stérilisé 15 min à 110°C	Lait en poudre	10 % (m/v)	Conservation des souches à - 80°C Préculture à 42°C
Lait reconstitué à 11,1% stérilisé 15 min à 110°C	Lait en poudre	11,1 % (m/v)	Acidité Dornic
M17 (Terzaghi et Sandine 1975) stérilisé 20 min à 120°C	Bactotryptone	2,5 g	Cultures Extraction d'ADN et de protéines
	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	
B-glycérophosphate de Na	19 g		
H <sub>2</sub> O qsp	1L		

## 2. Détection d'une activité protéolytique par zymographie

Le principe de cette méthode consiste en une séparation électrophorétique des protéines dans un gel de polyacrylamide-SDS imprégné de caséine à la concentration finale de 0,025%. L'activité caséinolytique de certaines protéines est alors mise en évidence par leur capacité à dégrader leur substrat. Après coloration du gel par le bleu de Coomassie, la présence de bandes blanches sur fond bleu (plages d'hydrolyse) indique la présence de protéases caséinolytiques (Raulo *et al.*, 2002).

### 2.1. Préparation des extraits protéiques bactériens

Pour chaque souche, des cultures en milieu M17 ont été réalisées à 42°C pendant 16h. Les cellules ont ensuite été récupérées par centrifugation à 4°C pendant 15 min à 3900 g.

Le culot a subi 3 lavages successifs dans du tampon phosphate de sodium ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM à pH 7) puis une congélation de 3h à  $-20^\circ\text{C}$ . Les cellules congelées ont ensuite été mises en suspension dans 5 mL de tampon phosphate et ont subi une sonication pendant 3 min à une puissance de 100 W avec un cycle actif de 50% (sonicateur Vibra cell 600 W ; Bioblock Scientific). Les débris cellulaires ont été séparés du contenu cellulaire soluble par centrifugation à  $4^\circ\text{C}$  pendant 10 min à 12000 g. Le surnageant contenant les protéines solubles intracellulaires a été conservé à  $-80^\circ\text{C}$ . Afin de libérer la protéase pariétale, le culot de débris cellulaires a été mis en suspension dans du tampon phosphate de sodium additionné de 10% de SDS et a subi une deuxième sonication pendant 1 min avec 50% de cycle actif et une puissance de 100 W. Après centrifugation à  $4^\circ\text{C}$  pendant 15 min et à 12 000 g, les débris cellulaires ont été éliminés et le surnageant contenant les protéines extraites de la paroi conservé à  $-80^\circ\text{C}$ .

## **2.2. Préparation des échantillons protéiques pour le zymogramme**

Les surnageants contenant les protéines solubles intracellulaires ou les protéines extraites des parois ont été placés dans un volume équivalent de tampon d'échantillon : Tris HCl 1 M pH 6,8 ; saccharose 4% ; bleu de Bromophénol 0,2% ; SDS 10%, sans 2-mercaptoéthanol et sans chauffage. L'absence du 2-mercaptoéthanol et du chauffage permet aux protéines après leur migration dans le gel d'électrophorèse de se renaturer et aux enzymes de retrouver leur activité. Les électrophorèses SDS-PAGE des protéines ont été réalisées dans des gels de polyacrylamide à 7,5% en pH discontinu. Les compositions des différentes solutions utilisées pour réaliser un zymogramme sont présentées dans le tableau 9. Les conditions électrophorétiques sont de 500 V, 60 mA et 30 W, pendant 2h30 à  $4^\circ\text{C}$ .

## **2.3. Mise en évidence des protéases par révélation de plages d'hydrolyse**

Afin de mettre en évidence les plages d'hydrolyse témoins de la présence de protéases, le gel a tout d'abord été incubé dans une solution de triton X100 pendant 1h30 sous agitation et à température ambiante (Tableau 10). Puis le gel a été placé pendant 48 heures dans une solution de tween 80 à  $37^\circ\text{C}$  et à pH 7,5, conditions optimales pour déceler l'activité de PrtS (Tableau 10). Le gel a alors été placé dans une solution de bleu de Coomassie R-250 pendant 2h, puis décoloré jusqu'à détection des plages d'hydrolyse (Tableau 10) (Raulo *et al.*, 2002). La masse moléculaire de la ou les protéase(s) présente(s) dans une plage de lyse a été estimée à l'aide des protéines marqueurs de masse moléculaire (BioRad) (Tableau 11).

**Tableau 9 : Composition des gels, des tampons d'échantillon et d'électrodes utilisés en électrophorèse SDS-PAGE des protéines**

**Gel de concentration**

<b>Produits</b>	<b>Quantité</b>
Acrylamide, bisacrylamide	T = 5%, C = 2,6%
Tris HCl pH 6,8	0,125 M
Dégazer le mélange pendant 15 min	
SDS	2,6 mM
TEMED	3,3 mM
Persulfate d'ammonium	2,2 mM

**Gel de séparation**

<b>Produits</b>	<b>Quantité</b>
Acrylamide, bisacrylamide	T = 7,5%, C = 2,6%
Tris HCl pH 8,8	0,375 M
Dégazer le mélange pendant 15 min	
Caséine	0,025 % (m/v)
SDS	2,6 mM
TEMED	3,3 mM
Persulfate d'ammonium	2,2 mM

**Tampon échantillon non réducteur**

<b>Produits</b>	<b>Quantité</b>
Tris HCl pH 6,8	1 M
Saccharose	4% (m/v)
Bleu de Bromophénol	0,2% (m/v)
SDS	10% (m/v)

**Tampon d'électrodes pH 8,3**

<b>Produits</b>	<b>Quantité</b>
Tampon Tris	0,25 M
SDS	3,5 mM
Glycine	0,192 M

**Tableau 10 : Composition des solutions utilisées pour la révélation de l'activité protéolytique lors d'un zymogramme (D'après Raulo SM. *et al.*, 2002)**

**Solution de Triton**

<b>Produits</b>	<b>Quantité</b>
Triton X100	2,7% (m/v)

**Solution de Tween 80**

<b>Produits</b>	<b>Quantité</b>
Tween 80	2,7% (m/v)
NaCl	50 mM
CaCl <sub>2</sub>	13,25 mM
Tris	20 mM
HCl	Ajuster le pH à 7,5

**Solution de bleu de Coomassie R-250**

<b>Produits</b>	<b>Quantité</b>
Bleu de Coomassie R-250	0,1% (m/v)
Ethanol	50% (v/v)
TCA	2 % (m/v)

**Solution de décoloration**

<b>Produits</b>	<b>Quantité</b>
Acide acétique glacial	7,5% (v/v)
Ethanol	30% (v/v)

**Tableau 11 : Marqueurs protéiques de référence (SDS-PAGE Standards, broad range, Bio-Rad) utilisés pour le zymogramme**

<b>Marqueur protéique</b>	<b>Masse moléculaire (kDa)</b>
Myosine du muscle de lapin	200
$\beta$ -galactosidase d' <i>Escherichia coli</i>	116,2
Phosphorylase b du muscle de lapin	97,4
Sérum albumine bovine	66,2
Ovalbumine de blanc d'œuf	45
Anhydrase carbonique bovine	31
Inhibiteur trypsique du soja	21,5
Lysozyme de blanc d'œuf de poule	14,4
Aprotinine du pancréas bovin	6,5

### 3. Mise en évidence et mesure de l'activité à l'aide d'un substrat synthétique

#### 3.1. Récupération des cellules

L'activité protéolytique de surface a été évaluée avec des cellules viables qui ont été obtenues après croissance en lait ou en milieu M17.

- Milieu M17

Pour des croissances effectuées en milieu M17, 10 mL de milieu de culture ont été centrifugés pendant 15 min, à 3 900 g et 4°C. Les culots bactériens obtenus ont ensuite été lavés à deux reprises (avec un barème de centrifugation identique au premier), après avoir été remis en suspension dans 4 mL de tampon TRIS-HCl, 100 mM, pH 7,0.

- Milieu lait

Lors des croissances en lait, il est indispensable d'utiliser une solution saline spécifique afin d'éliminer les caséines du lait. Ainsi, à 40 volumes de lait fermenté ont été ajoutés 5,3 volumes de solution saline (NaCl 0,85% (m/v) ; glycérophosphate de Na 0,5% (m/v) ; tween 80 : 0,1% (v/v) à pH = 7) ainsi que 1,3 volume de citrate trisodique 1M selon le protocole de récupération de cellules établi par Chopard *et al.*, 2001. Puis le mélange a été centrifugé pendant 15 min, à 3 900 g à 4°C. Les culots obtenus ont ensuite été lavés à deux reprises et remis en suspension dans 40 volumes d'eau distillée additionnée des mêmes volumes de solution saline et de citrate trisodique que précédemment.

Une fois l'intégralité des lavages effectués, les culots cellulaires provenant des deux milieux sont remis en suspension dans du tampon Tris-HCl, 100 mM, pH 7. La concentration cellulaire a été standardisée à  $5 \times 10^8$  ufc.mL<sup>-1</sup> par spectrophotométrie à 650 nm (soit DO<sub>650</sub> = 1) (Chopard *et al.*, 2001). Le fait que la concentration cellulaire soit standardisée entre les différentes suspensions cellulaires obtenues permet de pouvoir comparer les activités protéasiques obtenues chez différentes souches, dans les milieux M17 et lait, à des temps de croissance distincts.

### 3.2. Quantification des activités

Un test enzymatique permettant de détecter et mesurer l'activité PrtS a été utilisé. Le substrat à 2 mM (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pna) a été dissout dans 1 volume de N,N-diméthylformamide pour 9 volumes de tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 contenant 5 mM de CaCl<sub>2</sub>. Les échantillons ont été testés à 37°C, en mélangeant 1 volume de suspension cellulaire (DO<sub>650</sub> = 1) et 10 volumes de solution de substrat. Ces essais ont été réalisés en triplicat. L'activité enzymatique a été mesurée au spectrophotomètre à 410 nm.

Le même protocole a été utilisé avec le substrat Lys-pna pour détecter et mesurer des activités peptidasiques utilisées comme contrôle de lyse cellulaire.

## 4. Détermination du degré d'acidité Dornic

Dans un premier temps, 10 mL de lait reconstitué ont étéensemencés à 1% (v/v) avec une souche de *St. thermophilus* et incubés pendant 16h à 42°C. La préculture ainsi obtenue a été utilisée pour ensemencer à 1% (v/v) 300 mL de lait reconstitué à 11,1% (Tableau 8). Cette culture a alors été divisée en trois volumes de 90 mL auxquels ont été rajoutés 10 mL soit d'eau, soit d'une solution de bactotryptone (10% m/v), soit d'une solution de fluorofamide (N-[diaminophosphinyl]-4-fluorobenzamide; ICN, Orsay, France) (100 µM). Les 3 x 100 mL de culture ainsi obtenus ont alors été aliquotés en fraction de 10 mL. L'acidité Dornic a directement été mesurée sur 10 mL avant incubation. Les autres fractions ont été placées à 42°C et l'acidité Dornic a été déterminée en triplicat à 2h, 4h et 6h de culture.

Une mole de soude versée neutralise l'équivalent d'une mole d'acide lactique : la soude Dornic a un titre de 1/9 M. Une mole d'acide lactique CH<sub>3</sub>CHOHCOOH pèse 90 g/mol. Ainsi, 1 mL de NaOH Dornic versé correspond à  $1/9 \times 10^{-3}$  mole de OH<sup>-</sup> équivalent à  $1/9 \times 10^{-3}$  mole d'acide lactique soit  $1/9 \times 10^{-3} \times 90$  g d'acide lactique =  $10^{-2}$  g d'acide lactique dans 10 mL de lait soit 1 g d'acide lactique/L de lait. Sachant qu'un degré Dornic est égal à 0,1 g d'acide lactique/L de lait, un mL de soude versé correspond à 10 degrés Dornic. Il faut donc multiplier par 10 le nombre de mL de NaOH versé pour avoir l'acidité Dornic.

## **5. Extraction d'ADN génomique, réactions de PCR, conditions d'électrophorèse et séquençage**

### **5.1. Extraction d'ADN génomique**

A partir d'une culture de 24 h réalisée dans 50 mL de milieu M17, les cellules bactériennes ont été récupérées par centrifugation pendant 10 min à 3900 g et à 4°C, lavées 2 fois avec 5 mL de tampon TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 8 mM pH 8) et remises en suspension dans 5 mL de TE. Afin d'hydrolyser la paroi des bactéries, 250 µL d'une solution de lysosyme 5% (m/v) ont alors été additionnés. Après 1 h d'incubation à 37°C, 600 µL d'EDTA (0,5 M pH 8) et 50 µL d'une solution de protéinase K 2% (m/v) ont été ajoutés. Après 15 min d'incubation à 37°C, 660 µL d'une solution de SDS (10% m/v) ont été ajoutés et l'ensemble a été incubé à 50°C jusqu'à ce que les cellules soient lysées. Le lysat a ensuite été aliquoté à raison d'1 mL par tube et 350 µL d'acétate de potassium froid (5 M acide acétique, 3 M acétate de potassium) ont été ajoutés à chaque tube. Après 15 min d'incubation sur la glace, les surnageants contenant les acides nucléiques ont été récupérés après centrifugation (15 min à 4°C à 12000 g). Les ARN ont alors été éliminés grâce à l'addition d'une solution de RNase A 1% (m/v). Après incubation 60 min à 37°C, 1 volume de phénol saturé en eau et équilibré avec du Tris-HCl 0,1M pH 8 et un volume de chloroforme ont été ajoutés à chaque tube. Après, homogénéisation et centrifugation 10 min à 4°C et 12000 g, la phase aqueuse a été récupérée et un volume de chloroforme a été ajouté. Après une nouvelle centrifugation de 10 min à 4°C et 12000 g, la phase aqueuse a été récupérée et l'ADN génomique précipité par ajout d'un volume d'isopropanol froid. L'ADN a alors été lavé à l'éthanol à 70%, séché puis dissout dans 50 µL de l'eau ultra pure.

### **5.2. Condition standard d'amplification par PCR**

Le mélange réactionnel d'amplification (volume final : 50 µL) est composé de : 5 µL de tampon de PCR concentré 10 X (BioRad), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de chaque dNTP (Biorad), 50 pmol de chaque amorce, 1,25 unités de Taq Polymérase (Biorad) et environ 200 ng d'ADN génomique. Les différentes amorces utilisées ainsi que les températures d'hybridation sont indiquées dans le tableau 12. Les réactions ont été effectuées dans un thermocycler My Cycler (BioRad). Les amorces ont été dessinées à partir du génome de la

souche LMD-9, disponible dans les banques de données EMBL/GenBank, à l'aide du programme : Primer 3 input ([http://Prodom.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://Prodom.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)).

### **5.3. Electrophorèse d'ADN**

Un volume d'échantillon à analyser est additionné de 0,2 volume de tampon de dépôt (composé de 0,25% (m/v) de bleu de bromophénol, de 70% (m/v) de saccharose et de 0,1 M d'EDTA à pH 8) et soumis à une migration électrophorétique horizontale dans du tampon TAE (Tris acétate 40 mM, EDTA 1 mM). Le pourcentage en agarose des gels est choisi en fonction de la taille des fragments d'ADN à séparer. Les fragments d'ADN sont ensuite visualisés, après coloration des gels dans une solution de bromure d'éthidium à 0,5 µg/mL, sous UV (254 nm) grâce à l'utilisation d'un appareil GelDoc (Biorad). Les marqueurs de taille utilisés sont un EZ-Load 100 pb et 1kb (Biorad).

### **5.4. Séquençage**

Le séquençage des fragments d'ADN génomique amplifiés par la technique de PCR a été effectué par la société GENOME EXPRESS. Après évaluation de la spécificité d'amplification par électrophorèse sur gel d'agarose, les mélanges réactionnels de PCR ont été directement envoyés à la société GENOME EXPRESS qui a réalisé une élimination de l'ADN simple brin par action d'une exonucléase spécifique et un séquençage nucléotidique selon la méthode de Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Les séquences nucléotidiques obtenues et les séquences protéiques déduites ont été analysées par les programmes « BLASTN » et « BLASTP » afin de rechercher les pourcentages d'identité avec différentes séquences présentes dans les banques de données, via le site NCBI (<http://www.ncbi.nih.gov/>). Les alignements multiples ont été réalisés à l'aide du programme « ClustalW ».

**Tableau 12 : Amorces et température utilisées pour la réalisation d'amplification de séquences d'ADN génomiques par la technique de PCR**

Amorces (séquençage)	Séquence du coté 5' au coté 3'	Gène/Opéron	Température d'hybridation (°C)	
gyrA1for	AAGCAATTATAGTGTTCGAATTG	<i>gyrA</i>	58C°	
gyrA1rev	CAGTGTGCGTTTCAAAGAGGA			
gyrA2for	TGTCTTAATACCTTTACCACCA			
gyrA2rev	CGTGGAGGTCGTGGAGTTC			
gyrA3for	TCGTCGCTCTTAGCATTAAATCA			
gyrA3rev	CATCTGGATGAAGTGATTACGA			
gyrA4for	CAATAACACGTTCTGGTTTTGC			
gyrA4rev	AACCAAATCAGGTCGTGAGC			
gyrA5for	GTTCAAGATCACATTGGCAGA			
gyrA5rev	TTCTATGGATGGTGATGGCG			
gyrA6for	CAAATTGTGTGGTGGAAATGTTG			
gyrA6rev	TGAGAATTTGGAATAATTTGATTGA			
gyrA7for	AAACCGTCACGAACATCTGG			<i>ldh</i>
gyrA7rev	GGTTTTTACCAACAAGATCAAG			
gyrA8for	TTTCGCACTTGTAACCAAGG			
gyrA8rev	GCGATACCGTAGTATGTAGCA			
gyrA9for	TGTCGATGCTCGTTCAGTTC			
gyrA9rev	AGGAGTAACAATTGACCGTCT	<i>ackA</i>		
ackA1for	GTCAAATTTGCTTTACATTTATGG			
ackA1rev	ATGTGGGAAATGGTGTTCAT			
ackA2for	CACGCATATCGCTTGATTTTTC			
ackA2rev	CCGTTCTGAATCGCAAACCTT			
ackA3for	TGCACCTGGATTGTGTAACG			
ackA3rev	GCCCATCATCTTCTTATGGAG	<i>dtpT</i>		
dtpT1for	ACGATGTGACACGGAATGCT			
dtpT1rev	TGATTCATCTTGGTTCCTGT			
dtpT2for	TGATACTTTACCACTTGTGCC			
dtpT2rev	GGTATTAACCTGGGTGCGTTC			
dtpT3for	ACAGCTAAGCTTACTTTAACCA			
dtpT3rev	TCAACCGGAGGATTTTATGGA			
dtpT4for	AAAGGTAAACCATTGAAGCGTA			
dtpT4rev	GGTATATATAAGGCAGACCTGA	<i>bcaT</i>		
bcaT1for	CTCACCGTGTCTTCACAGCT			
bcaT1rev	CAAGCATCTACAAATTTTCCAC			
bcaT2for	AAATGGGATGAGGGGCAATTG			
bcaT2rev	ATACCAAACGATTTTCAGCCA			
bcaT3for	ACTACGCGGCAAGTATGTTG			

bcaT3rev	CCTTCAATGGTTGCTTTGTTT	<i>bcaT</i>	58°C
pepC1for	GTGTCTCATAACCCAGCGATA	<i>pepC</i>	
pepC1rev	ACGACCATATCCCATTGTCC		
pepC2for	GATGTTTGCGGCCCTTAATA		
pepC2rev	CCATGCTAGCTGTAAAGTCG		
pepC3for	CGGAAAATCTTACACGGTTGA		
pepC3rev	GGGTTCTAACGGTGCTGAG		
pepX1for	GAACAATCCAGATGCAGCAAGT	<i>pepX</i>	
pepX1rev	TGAAGGGCTACTAAGCCAAAGA		
pepX2for	CCTGAAACGGCTTATCAGGAA		
pepX2rev	CTCCATCTTGTGGGTCAGTTT		
pepX3for	AATGGTAAGAGCTTGGCAACA		
pepX3rev	ATCTCCAAACCGTCAACACC		
pepX4for	GTGTCCGTTACTTTCAACTCG		
pepX4rev	ACTGCCAGGCATTCATGTAAA		
pepX5for	ATTGATCGTAAGCATGGGGATT		
pepX5rev	AGGTATTGGAGCTAGGTATTTTT		
pepX6for	CGCTAACCAATTACGAAGAGGA		
pepX6rev	CTGACAGCTTTATGCTTTATTTTT		
pepN1for	GGTCGAAGAAGCTCTCGAAGT	<i>pepN</i>	
pepN1rev	ACCAGTCATATTATCTGTGATGC		
pepN2for	GGAATGTTGCCATTACTGGTG		
pepN2rev	TAACAAGACCCCAGTTTTCCA		
pepN3for	GTTTCGGTGCTCTTCATGGT		
pepN3rev	AGCATTCCAAAGGTCACGTC		
pepN4for	CTCTTCAACGTGACGCAACA		
pepN4rev	TCAAGAAGCTTTCTTCTTTTTTCG		
pepN5for	GTCTTAATACAGCTAATACAGC		
pepN5rev	AGAGATACAAATCTTGCGGTTT		
pepN6for	AAAGCATTCCAGCAAGTATCC		
ilvC1for	TACCGATAAGATTGACAATGAAAT	<i>ilvC</i>	
ilvC1rev	GTCGTACATTTGAAGAAGGTTT		
ilvC2for	AAGGGCAGTCAAACCACCAC		
ilvC2rev	GATGTTGCACCAAGCTCTATC		
ilvC3for	GCTAGGTTAACAAATTTATAATGGA	<i>ilvDBN</i>	
ilvC3rev	CAAGGTGTCAATCAAGGTTGTTA		
ilvC4for	AATCCCATAAGCTTGAGCCAT		
ilvC4rev	TGCAGAACGCTACCAAATTCC		
ilvC5for	GATTACCTGTCAAGCGGTC		
ilvC5rev	TCGAACTTGGGATTTCAACC		
ilvC6for	AACACCAAGTTTCCCAGTTGA		
ilvC6rev	GCTCTTGAATTGATTGATAATGGA		
ilvC7for	ACCTTCCGCAGCTTCTGGAG		
ilvC7rev	GCCACAAAATTAATGGATAACA		
ilvC8for	TGTACATCATGCATGGTATAG		
ilvC8rev	TTGCCAAGGAGGCTATCCG		
ilvC9for	GCCAAAATCATTCCTGGTGTA		
ilvC9rev	AGGACATGATGGTGCAGGGT		

livJ1for	AGACTTACGTAAAATTGCCAAG	<i>livJHMGF</i>	58C°
livJ1rev	TACCGTAAGGTCATCCTGTGT		
livJ2for	AAATGCTGAGGCTTCAACATCT		
livJ2rev	ATGATCCTTGTCAATTGTCATTTT		
livJ3for	AGAAAGCTTACAAAATTGAACCAA		
livJ3rev	ACAGACACAGCACGCATAGC		
livJ4for	ATACACGTTCATTCCCACAAT		
livJ4rev	TGCGATGATGACACCTACAA		
livJ5for	AATCCTTATGGGACTTGGTACT		
livJ5rev	CCATTTTTATTTGCCCTCCTTA		
livJ6for	TCAACATGTTCTCCAAAACG		
livJ6rev	AGATACGCTCAGTGACATCCA		
livJ7for	GCTTGCGAAAACTTGGCTT		
livJ7rev	CCCATCGCTAGCATCTGTTG		
livJ8for	GTTGCAGAAGGTTTGGCTCAA		
livJ8rev	CTGTTGTTTCTGGTGAGACGTA		
amiC1for	CTTGACCGGAAATGCAACAAA	<i>amiA1CDEF</i>	
amiC1rev	GATTGCGCGTTCTTTGGTCAT		
amiC2for	AGCAACTTCCACGATTGTCC		
amiC2rev	AGAAGTTCGTTGCTGTCCAC		
amiC3for	GCAGGGTCTTGGAAAATCATC		
amiC3rev	GAATACGCAACTGTTGAGGAAA		
amiC4for	GAAACTTGGAATTGTGGTGCT		
amiC4rev	TTCCAAGATCCAATGACCAG		
amiC5for	GCAATAACGATACGTTGACGC		
amiC5rev	GTCAATGCCTATCTCTTCTGG		
amiC6for	CCCCTCGAATAGCTGTCAAAA		
amiC6rev	CTGTTTGGGGGATTTCTAAGA		
amiC7for	CCAAATTGCGAGAAGCCAAGT		
amiC7rev	CATCTTCTCATTGCTTGTGGG		
amiC8for	CCAACATTACAACGTTGATTTC		
amiC8rev	TCTTTGATAGTGTGTCAACAGG		
amiC9for	GTCAATCATGTAACGACGAATC		
amiC9rev	CAAATCCAACTTGAAGCGTTAT		
amiC10for	TCTGTCCTTGGCCTTGTGTA		
amiC10rev	AGAACACTCCGTTCTCTATTG		
relA1for	AGGATTTTCGACATCTCCATTG	<i>relA</i>	
relA1rev	GCGTCTTTTCCGTGTCTTCA		
relA2for	GAGAAGAAATTTTAGACGTTTGC		
relA2rev	TCGACAATCTCGTCCACAAGT		
relA3for	CGTACTCTCAAGCATCTTCGT		
relA3rev	ATCCAATTCATTCCCAAAGCAG		
relA4for	TCCTATGCCTGGACGTTTCA		
relA4rev	GCCATGCTCTTGGAAATAGG		
relA5for	GGTGCCAAGGTTAATGGTGC		
relA5rev	CGTTGCTCATAACCTTCTTGA		

relA6for	GAATGGTGGCGAAGTCAAGA	<i>relA</i>	58°C
relA6rev	TCATCTTGCCATCTTCATCTG		
murE1for	GAACCCTCAGCGGACTATCA	<i>murE</i>	
murE1rev	GAGGACTGTCCCCGTTAGC		
murE2for	AATCGCTGTCTTGGAGATTGA		
murE2rev	GGATGGTCTGCAAGTTTAATCA		
murE3for	CAACATCTATAATGCCCTTGCT		
murE3rev	GAGCTCCTTGTCGAAGTCGT		
Prt For	TACGGTGAATGGTTTAACG		
Prt Rev	AATTACTTTACTACCAACCG		
Style 1	CCAACAACAAGGCACTCATTA		
Style 2	GTTGAGTTGTTTCTACTTCTGT		
Style 3	ACTAAGGTGGAAGCAACTGTT		
Style 4	ATTGTCCAGCGACTGGTTGT		
Style 5	CAGCTGGTAATGATGGAACAT		
Style 6	CCAACCTGAAAAATCTGAAAGAA		
Style 7	CAATTCATCTGTCTTCATTC		
Style 8	CCGTTGTTAATTGTGTTGAGT		
Style 9	GTTTATATTTGACTGGCGAAG		
Style 10	GTCTTGATCGCAGAGTCAG		
Style 11	GAACCTGTTACAGCACAGC		
Style 12	GCTGGACGAGGGTTAAATG		
Style 13	GTTCCAGGTGCAGCAGTACA		
Style 14	ACCAAATGGTAGCTTAAGAACG		
Style 15	TCAGTCACCGATGAAACAGG		
Style 16	ATAGGCAGTTTGAAGTTCTGG		
Style 17	ACTTGCAAACCAGTCAAATGTTA		
Style 18	CGCTGCTTCAACTGCCTGG		
Style 19	GCAGCGAAAGCCAACTTAGA		
Style 20	TTCCTTGTGACGTCGTATGC		
Style 1-1	ACAAATTCATGCCGTTCATAAG		
Style 1-2	TTGTTCGGCATCGCAAGTATAT		
Style 20-1	ATTCAGAGCATGTACCGATAG		
Style 20-2	TGATCTGAGAACATAAGGGTC		
Prtsboitefor	TTGTTGTCAACGAACTTTGGA		
Prtsboiterev	TGGCTCCGTCCTTAATGAAAAT		
CodY1	TAGGCTTCTTGCGTTACCTGA	<i>codY</i>	
CodY2	CCAGAGGAATACATACGTGGT		
CodY3	AGTCAAACCGTCAGGGAAATC		
CodY4	AAGGTCCTCTTGGTTCCAGG		

Les amorces ont été dessinées au cours de cette étude à partir du génome de la souche LMD-9 et fournies soit par la société Invitrogen soit par la société IDT (Integrated DNA Technologies).

## 6. Analyse de l'expression des gènes

L'analyse de l'expression des gènes a été réalisée en utilisant la technologie de RT-PCR quantitative.

### 6.1. Récupération des cellules

L'ARN total a été extrait de cellules entières cultivées en milieu M17 ou dans du lait.

- Milieu M17

Après croissance dans 45 mL de milieu M17, les culots bactériens ont été récupérés par centrifugation 15 min à 3900 g et 4°C puis conservés à - 80°C dans de l'azote liquide.

- Milieu lait

Pour chaque essai, le volume de lait fermenté traité a été de 80 mL. Lors de croissance, les cellules ont été récupérées comme précédemment en utilisant le protocole établi par Chopard *et al.*, 2001. Le culot obtenu a été mis en suspension dans 46,6 mL de tampon froid d'extraction (5 mM phosphate de Na ; 1 mM EDTA ; 2 mM  $\beta$ - mercapto-éthanol ; pH = 7) (Derzelle *et al.*, 2005; Guimont *et al.*, 2002). Il a ensuite été centrifugé (15 min à 3900 g et 4°C). Les culots bactériens ont alors été congelés à - 80°C dans de l'azote liquide.

### 6.2. Extraction et quantification de l'ARN total

Les ARN totaux ont été extraits par la méthode de Chomczynski *et al.* (Chomczynski, 1993; Chomczynski et Sacchi, 1987) à l'aide du réactif Trizol.

Le culot bactérien a été suspendu dans 4 mL de Trizol et incubé pendant 5 min à température ambiante pour permettre la dissociation complète des complexes nucléoprotéiques. L'homogénat a ensuite été aliquoté. A 5 volumes d'homogénat a été ajouté 1 volume de chloroforme. Après homogénéisation, les protéines ont été séparées des acides nucléotides par centrifugation à 12 000 g et 4°C pendant 15 min. La phase aqueuse a été récupérée et un volume d'isopropanol froid a été ajouté afin de précipiter l'ARN. Après une centrifugation à 12 000 g et 4°C pendant 20 min, le culot contenant l'ARN a été récupéré, lavé à l'éthanol 70% (v/v), séché, puis dissout dans 90  $\mu$ L d'eau ultra pure.

Afin d'éliminer l'ADN génomique présent dans les échantillons, l'ARN préparé a été traité une première fois à la DNase I. Pour cela, la solution d'ARN a été placée en présence de 1 µl de DNase I (10 U/µL) et de 10 µL de tampon concentré 10X (DNase I recombinant, RNase-free, Roche), ainsi que de 1 µL d'un inhibiteur de RNase (40 U/µL) (RNaseOUT™, Invitrogen) pendant 30 min à 37°C.

Après la première étape d'élimination de l'ADN génomique, l'ARN a été purifié par la méthode phénol/chloroforme. Pour cela, à deux volumes de solution d'ARN, un volume d'acétate de sodium (3M, pH 6) et 3,5 volumes d'eau ultra pure ont été ajoutés. Cinq volumes de phénol/chloroforme ont ensuite été ajoutés et le mélange a été homogénéisé puis centrifugé pendant 5 min à 12 000 g et 4°C. La phase aqueuse a été récupérée et un volume d'isopropanol froid a été ajouté. Après une incubation de 10 min à température ambiante, une seconde centrifugation a été effectuée 20 min à 12000 g et 4°C. Le surnageant a alors été éliminé et le culot d'ARN lavé avec un volume d'éthanol à 70% (v/v), séché, et dissout dans de l'eau ultra pure. L'ARN total obtenu a été quantifié par mesure de l'absorbance à 260 nm ( $A_{260\text{ nm}}$ ), après dilution adéquate de l'ARN dans de l'eau ultra pure. La concentration d'ARN ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) a été obtenue grâce à la relation suivante :

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

Enfin, 4 µg de l'ARN récupéré ont subi un second traitement avec le TURBO DNase (fourni dans le kit TURBO DNA-free™, Ambion), permettant d'assurer l'absence complète d'ADN génomique. Pour cela, les ARN ont été placés 90 min à 37°C en présence de 3 µL de TURBO DNase et de 2 µL de tampon concentré 10X. La réaction de 20 µL a été interrompue par ajout de 4 µL de réactif spécifique pour l'inactivation fourni avec le kit. Après 5 min d'incubation à température ambiante, le surnageant a été récupéré par centrifugation à 12000 g et 4°C pendant 1,5 min.

### **6.3. Préparation des ADN complémentaires**

L'ARN a ensuite été converti en ADN complémentaires par RT-PCR. L'ARN total a été dénaturé 5 min à 65°C en présence de 5 µl des Random primers (200 µg/mL), 2,5 µl de dNTP (10 mM) (Bio-Rad) et 7,5 µl d'eau stérile.

Après refroidissement rapide dans la glace, 2,5 µl d'un inhibiteur de RNase (RNaseOUT™, Invitrogen), 10 µl de tampon 5X (Invitrogen) et 5 µl de DTT 0,1M (Invitrogen) ont été ajoutés et le mélange a été incubé 2 min à 37°C. Après ajout de 2,5 µl de Reverse Transcriptase M-

MLV (Invitrogen), la rétrotranscription a été réalisée 10 min à 25°C puis 50 min à 37°C. La rétrotranscription a été stoppée par incubation à 70°C pendant 15 min et les ADNc ont été conservés à - 20°C. Les banques d'ADNc ainsi obtenues ont ensuite été utilisées comme matrice dans les expériences de PCR quantitative.

#### **6.4. Design des amorces**

Les amorces ont été dessinées également avec le logiciel Primer 3 input ([http://Prodom.wi.mil.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://Prodom.wi.mil.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)). Les caractéristiques choisies pour les amorces ont été : une taille d'amplicon comprise entre 75 et 150 pb, un Tm de 58°C et une taille d'amorce comprise entre 19 et 22 pb. L'ensemble des amorces utilisées pour la réalisation des RT-PCR est présenté dans le tableau 13.

#### **6.5. PCR en temps réel**

La PCR en temps réel a été réalisée au moyen d'un thermocycleur couplé à un module de détection de type MJ Opticon Monitor<sup>TM</sup> (Biorad). Les réactions ont été effectuées sur des plaques 96 puits, chaque puits contenant 7,5 µl de MESA GREEN SYBR Assay No ROX (Eurogentec), 1,5 µl de chaque amorce (à 1 µM chacune), 25 ng d'ADNc et 2,5 µl d'eau ultrapure. Après avoir été recouverte, la plaque a été centrifugée 30 s à 5000 g. Le cycle de PCR qui a été utilisé est constitué d'une dénaturation primaire à 95°C pendant 5 min, suivie de 40 cycles d'amplification (95°C pendant 15 s et 58°C pendant 45 s).

#### **6.6. Quantification des niveaux d'expression**

Le principe de la PCR quantitative en temps réel est basé sur la détection et la quantification d'un indicateur fluorescent (dans cette étude, il s'agit du Sybr-Green) de la production d'amplicons durant chaque cycle d'amplification. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR. Ainsi, grâce à un système de détection de la fluorescence, la courbe d'amplification de l'ADNc au cours du temps peut être tracée. Le seuil de détection de la fluorescence n'est atteint qu'après un certain nombre de cycles d'amplification. Le premier cycle de démarrage de la phase d'amplification correspond au cycle seuil (Threshold Cycle) définie par la valeur Ct. Ce nombre-seuil est en fonction de la quantité initiale de séquences d'ADNc cibles

**Tableau 13 : Séquence et position d'hybridation des amorces utilisées pour la quantification des gènes cibles au cours de cette étude**

<b>Primers (RT- PCRq)</b>	<b>Séquence ; gène (STER_#)<sup>a</sup> ; Distance/ATG<sup>b</sup></b>
amiFquantfor	CTTCCACGATTGTCCCCTTAT ; <i>amiF</i> (1405) ; + 694
amiFquantrev	TTCGTGCCCAAGTTTTGAATTT ; <i>amiF</i> (1405) ; + 553
AckAquantfor	CCCGCTGTAAAGACGATAGC ; <i>ackA</i> (1834) ; + 992
AckAquantrev	TTGCTGGTAAAGAGGCTGGT ; <i>ackA</i> (1834) ; + 862
gyrquantfor	GCTCACGACCTGATTTGGTT ; (Gyrase sous unité A) (1256) ; + 763
gyrquantrev	GTTCTTCCCGGTCCAGACT ; (Gyrase sous unité A) (1256) ; + 624
lactquantfor	AACACGGCGACTCAGAGTTT ; <i>Ldh</i> (1257) ; + 558
lactquantrev	TAAGCTGCATCACGAACACC ; <i>Ldh</i> (1257) ; + 677
livJquantfor	TTGCGGCCTATGGTAAGTCT ; <i>livJ</i> (0398) ; + 154
livJquantrev	TTGAAGCCTCAGCATTTCAG ; <i>livJ</i> (0398) ; + 289
relAquantfor	GGAGCAGTTGGCTGAAAATC ; <i>relA</i> (0200) ; + 350
relAquantrev	GCTCCTGCTTATCCTTACGAA ; <i>relA</i> (0200) ; + 484
murEquantfor	TTGTGCCAGAGCAAATCAAAG ; <i>murE</i> (1233) ; + 838
murEquantrev	GGCTAGCTCCAACCTGGATTC ; <i>murE</i> (1233) ; + 964
ilvCquantfor	TAAAGGGCAGGTACACCAAAA ; <i>ilvC</i> (1848) ; + 452
ilvCquantrev	GTTTTGCTCACGTTTCAACA ; <i>ilvC</i> (1848) ; + 313
ilvBquantfor	AGCCAATTCTTGGTTCGTCAT ; <i>ilvB</i> (1850) ; + 1368
ilvBquantrev	GGCCTTGGAACCTATGGGATT ; <i>ilvB</i> (1850) ; + 1245
dtptquantfor	AACGTTCTGTTGCCGTAACC ; <i>dtpT</i> (0984) ; + 838
dtptquantrev	CGTTGTGATGAACCTTGTCG ; <i>dtpT</i> (0984) ; + 704
bcaTquantfor	CCAGCCCTTCACTATGGTC ; <i>bcaT</i> (0635) ; + 141
bcaTquantrev	GGCATCAAAGACGATCAGCA ; <i>bcaT</i> (0635) ; + 275
pepCquantfor	GGACAATGGGATATGGTCGT ; <i>pepC</i> (0276) ; + 434
pepCquantrev	GATTTGGGCATCTTGACGAAG ; <i>pepC</i> (0276) ; + 555
pepNquantfor	CGTCTTCTAGCGGAAAGTGG ; <i>pepN</i> (1012) ; + 1659
pepNquantrev	CGTTTCAAACCAGCAAGGATT ; <i>pepN</i> (1012) ; + 1784
pepXquantfor	AGGGAGACTTGCTCGTCAAA ; <i>pepXP</i> (1633) ; + 679
pepXquantrev	AGTGTGAGCAAAACGCTCCT ; <i>pepXP</i> (1633) ; + 804
codYquantforprim	GATAAGGTCGTCGTCCACAA ; <i>codY</i> (1599) ; + 435
codYquantrevprim	ACCATCTTCCCAGTGGAATTA ; <i>codY</i> (1599) ; + 297
pptsquantforprim	AATGCTTTAGCAGATGGTAAGT ; <i>ppts</i> (0846) ; + 2898
pptsquantrevprim	CATAGGTAGCTGTGGTGATAA ; <i>ppts</i> (0846) ; + 3031
F-sigmaquantfor	CCAAATGGCTGTCATCCTCT ; (sigma70/sigma32) (1448) ; + 826
F-sigmaquantrev	GACCCAACACCTGAGCAAAT ; (sigma70/sigma32) (1448) ; + 696

<sup>a</sup> : La position du gène concerné sur le génome de *St. thermophilus* LMD-9.

<sup>b</sup> : La position relative en paires de bases vis à vis de l'ATG du gène correspondant, - en amont, + en aval.

présentes dans la réaction de PCR. En fait, plus la valeur Ct est élevée, plus la quantité initiale d'ADNc présents dans la réaction de PCR est faible. Pour valider le Ct de chaque échantillon, la réaction est réalisée en triplicat et la moyenne des trois valeurs de Ct est utilisée.

Dans cette étude, pour normaliser la quantité d'ADNc présents dans chaque échantillon, le niveau de transcription des gènes cibles a été comparé à celui d'un gène de référence : le gène codant le facteur sigma (sigma70/sigma32), qui contrôle les fonctions de ménage essentielles et assure ainsi la transcription de base chez les bactéries. Ce gène est donc supposé être exprimé à toutes les phases de croissance à des niveaux similaires entre les deux souches étudiées en lait et en milieu M17.

La technologie de la PCR quantitative passe par un traitement mathématique des données et permet ainsi une certaine liberté au niveau de la forme des résultats obtenus. La quantification des niveaux d'expression a été effectuée en utilisant la méthode  $\Delta\Delta Ct$  (Livak et Schmittgen, 2001), méthode utilisée de façon habituelle pour déterminer des niveaux d'expression en RT-PCRq. Pour chaque condition analysée (X et X0), la différence de Ct obtenue entre le gène d'intérêt et le gène de référence donne les valeurs  $\Delta Ct_X$  et  $\Delta Ct_{X0}$ . Le  $\Delta\Delta Ct$  est obtenu par la différence  $\Delta Ct_X - \Delta Ct_{X0}$ . Ainsi, trois types de calcul ont été réalisés :

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{cible}} - Ct_{\text{référence}})_{\text{souche X}} - (Ct_{\text{cible}} - Ct_{\text{référence}})_{\text{souche X0}}$$

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{cible}} - Ct_{\text{référence}})_{\text{Phase X}} - (Ct_{\text{cible}} - Ct_{\text{référence}})_{\text{Phase X0}}$$

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{cible}} - Ct_{\text{référence}})_{\text{Lait}} - (Ct_{\text{cible}} - Ct_{\text{référence}})_{\text{M17}}$$

Ces relations, ont permis de comparer le niveau de transcription de chaque gène respectivement entre les deux souches étudiées (stade de croissance et milieu de culture identique), entre chaque phase de croissance (pour une même souche et un même milieu) et entre le lait et le milieu M17 (pour une même souche et pour un même stade croissance).

Pour obtenir la quantification, le calcul est basé sur le fait que la quantité d'ADN doit doubler à chaque nouveau cycle de PCR, soit après N cycles une quantité d'ADN  $2^N$  fois dans le cas où l'efficacité de PCR est de 100%.

Le niveau d'expression est ainsi donné par la relation :

$$\text{Niveau expression} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

## **IV. Résultats**



# Chapitre 1

## Chapitre 1 : Publication n°1

### **Variability and molecular typing of *Streptococcus thermophilus* strains displaying different proteolytic and acidifying properties**

#### **Résumé :**

Les pouvoirs acidifiant et protéolytique des différentes souches de *St. thermophilus* isolées de yaourts ou de fromages ont été estimés. Parmi les 30 souches testées, 12 montrent une forte activité caséinolytique de surface (PrtS<sup>+</sup>), 3 une légère activité (PrtS<sup>+/-</sup>) et 15 dont 8 possédant le gène *prtS*, en sont dépourvues (PrtS<sup>-</sup>). La séquence du gène *prtS* établie chez 4 souches (PrtS<sup>-</sup>) et une souche (PrtS<sup>+</sup>) a révélé que l'absence de l'activité caséinolytique de surface chez les souches (*prtS*<sup>+</sup> PrtS<sup>-</sup>) est due, tout probablement, à une altération dans la régulation du gène *prtS*. Les souches présentant un fort pouvoir acidifiant ont montré une forte activité protéolytique (PrtS<sup>+</sup>). Toutes les souches (PrtS<sup>+</sup>), sauf deux, sont proches phylogénétiquement, comme le montre l'analyse de la séquence intergénique ITS (pour Internal Transcribed Sequence) 16S-23S. Plus précisément, les capacités de forte activité protéolytique et fort pouvoir acidifiant sont associées à la présence d'un ITS de type II.



## Variability and molecular typing of *Streptococcus thermophilus* strains displaying different proteolytic and acidifying properties

Wessam Galia, Clarisse Perrin, Magali Genay, Annie Dary\*

Unité de Recherche sur l'Animal et les Fonctionnalités des Produits Animaux, U.C. Institut National de la Recherche Agronomique 340, Nancy-Université, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 6 May 2008

Received in revised form 11 August 2008

Accepted 12 August 2008

### ABSTRACT

Proteolytic and acidifying properties of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from yoghurt or cheeses were evaluated. Among 30 strains tested, 12 exhibited cell envelope-associated proteinase activity (PrtS<sup>+</sup>), three displayed a slight PrtS activity (PrtS<sup>+/-</sup>) and 15 were PrtS<sup>-</sup>, despite the presence of the corresponding gene (*prtS*) in eight of them. Sequencing of the *prtS* gene in four PrtS<sup>-</sup> and one PrtS<sup>+</sup> strains revealed that the absence of PrtS activity in the PrtS<sup>-</sup> strain probably results from an alteration of the *prtS* regulation. The strains displaying the highest acidifying capacities were all PrtS<sup>+</sup>. All but one PrtS<sup>+</sup> strains were phylogenetically close, as shown by the sequencing of their rDNA internal transcribed spacer (ITS) 16S-23S. More specifically, the high proteolytic and acidifying capacities are associated with the presence of a type II-ITS.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Lactic acid bacteria (LAB) require an exogenous source of amino acids or peptides for optimal growth since they are unable to synthesize several amino acids. Since the concentrations of amino acids or peptides in milk are not sufficient to ensure growth at high cell density, LAB need to utilise caseins as an amino acid source. Caseins are hydrolyzed to peptides and amino acids by cell envelope-associated proteinases (CEP) and intracellular peptidases. The CEP of lactococci have been extensively studied. They are inhibited by serine protease inhibitors and the mechanism of secretion, maturation and attachment to the cell wall has been well characterized (Savijoki et al., 2006). Several other LAB, such as *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* or *Lactobacillus helveticus*, have been reported to possess a CEP (Gilbert et al., 1996; Pederson et al., 1999).

The thermophilic LAB *Streptococcus thermophilus* is widely used as a starter to produce fermented milk products because of its capacity to produce lactic acid by catabolising lactose, so contributing to milk acidification and to its organoleptic properties. Some *S. thermophilus* strains are unable to decrease the pH to a value lower than 5.2 and therefore are commonly mixed with other starter bacteria. Among a collection of 97 *S. thermophilus* strains, the three strains displaying the highest acidifying capacities also showed the highest proteolytic activities (Shahbal et al., 1991). The presence of high proteinase activities allowed these strains to grow and produce

acid more rapidly in milk than the other 94 strains could (Shahbal et al., 1993). The CEP (called PrtS) of one of these three strains (strain CNRZ385) has been characterized. It belongs to the subtilisin-like serine protease family and is covalently associated to the cell wall via its LPXTG amino acid motif (Fernandez-Espla et al., 2000; Shahbal et al., 1993). These results raise several questions that are addressed in the present work. First, does the low level or absence of CEP activity in 94 out of 97 strains (Shahbal et al., 1991) result from an absence or mutation of the corresponding gene? Indeed, among the three genomes that have been sequenced in the *S. thermophilus* species, only one (that of strain LMD-9) possesses a *prtS* gene. The second question concerns the variability of the gene encoding the CEP in *S. thermophilus*, and a third question concerns the phylogenetic relationships existing between strains that display different acidifying and proteolytic potential.

### 2. Materials and methods

#### 2.1. Bacterial strains and growth conditions

*S. thermophilus* strains used in this work are listed in Table 1. They were isolated in our laboratory either from yoghurt or from cheese (P. Bracquart, personal communication), or came from the CNRZ (Centre National de Recherches Zootechniques, INRA, Jouy-en-Josas, France) collection or ATCC (American type culture collection, Manassas, VA, USA). Strains were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  in reconstituted skim milk (10%, w/v). Cultures were incubated overnight in skim milk at  $42^{\circ}\text{C}$  before each experiment. For DNA extraction or proteolytic and urease activity studies, *S. thermophilus*

\* Corresponding author. Tel.: +33 83684267.

E-mail address: [Annie.Dary@sbiol.uhp-nancy.fr](mailto:Annie.Dary@sbiol.uhp-nancy.fr) (A. Dary).

**Table 1**

*S. thermophilus* strains used in this work and genotypic and phenotypic (proteolytic activity and acidifying capacities) properties.

<i>S. thermophilus</i> strain	Strain origin	Type of 16S-23S ITS	Detection (+) or not (-) of <i>prtS</i> gene and PrtS activity		Acidity produced on growth in milk (Dornic degree) <sup>a</sup>			
					Without bactotryptone		With bactotryptone	
					4 h	6 h	4 h	6 h
CNRZ21	Yoghurt	ITS-St-I	<i>prtS</i> <sup>-</sup>	PrtS <sup>-</sup>	0.9 ± 0.8	9.3 ± 1.1	32.2 ± 2.6	59.6 ± 1.9
CNRZ307	Cheese	ITS-St-I	<i>prtS</i> <sup>-</sup>	PrtS <sup>-</sup>	8.3 ± 0.3	12.7 ± 0.4	45.9 ± 2.3	65.1 ± 2.6
CNRZ1066	Yoghurt	ITS-St-I	<i>prtS</i> <sup>-</sup>	PrtS <sup>-</sup>	9.3 ± 2.0	22.8 ± 1.5	44.3 ± 1.4	63.1 ± 4.4
PB180	Cheese	ITS-St-I	<i>prtS</i> <sup>+</sup>	PrtS <sup>-</sup>	10.4 ± 0.8	26.1 ± 0.9	51.5 ± 2.2	63.8 ± 1.3
ATE11PB6	Yoghurt	ITS-St-I	<i>prtS</i> <sup>+</sup>	PrtS <sup>-</sup>	13.3 ± 1.8	31.9 ± 2.1	59.3 ± 0.1	72.3 ± 2.8
ST19	Yoghurt	ITS-St-V	<i>prtS</i> <sup>+</sup>	PrtS <sup>-</sup>	15.0 ± 2.5	20.5 ± 0.1	50.0 ± 1.9	67.3 ± 2.0
PB5	Yoghurt	ITS-St-I	<i>prtS</i> <sup>-</sup>	PrtS <sup>-</sup>	15.3 ± 1.2	29.8 ± 1.2	47.3 ± 2.5	65.3 ± 1.5
HAD8z	Yoghurt	ITS-St-I	<i>prtS</i> <sup>+</sup>	PrtS <sup>-</sup>	15.5 ± 0.6	25.4 ± 3.0	54.7 ± 0.4	69.3 ± 1.4
CNRZ445	Cheese	ITS-St-I	<i>prtS</i> <sup>+</sup>	PrtS <sup>+/-</sup>	15.7 ± 0.3	30.8 ± 1.0	55.7 ± 2.3	81.5 ± 1.0
ST20	Yoghurt	ITS-St-I	<i>prtS</i> <sup>+</sup>	PrtS <sup>-</sup>	16.3 ± 1.8	30.5 ± 1.1	20.8 ± 1.7	54.2 ± 2.3
CNRZ160	Yoghurt	ITS-St-I	<i>prtS</i> <sup>-</sup>	PrtS <sup>-</sup>	17.2 ± 2.1	35.0 ± 3.2	48.8 ± 0.8	71.8 ± 1.7
ST14	Yoghurt	ITS-St-I	<i>prtS</i> <sup>-</sup>	PrtS <sup>-</sup>	18.4 ± 1.0	30.9 ± 0.1	52.8 ± 2.4	65.5 ± 1.0
CNRZ407	Yoghurt	ITS-St-I	<i>prtS</i> <sup>+</sup>	PrtS <sup>-</sup>	19.3 ± 0.5	31.2 ± 1.8	42.9 ± 1.8	69.9 ± 1.7
CNRZ404	Yoghurt	ITS-St-I	<i>prtS</i> <sup>+</sup>	PrtS <sup>+/-</sup>	20.0 ± 1.6	33.5 ± 0.3	59.5 ± 1.1	85.4 ± 0.4
HAD17	Yoghurt	ITS-St-I	<i>prtS</i> <sup>+</sup>	PrtS <sup>-</sup>	20.2 ± 2.6	31.6 ± 2.4	46.3 ± 2.7	64.8 ± 1.3
CNRZ308	Cheese	ITS-St-V	<i>prtS</i> <sup>+</sup>	PrtS <sup>-</sup>	20.4 ± 2.3	30.6 ± 2.1	41.8 ± 2.2	65.1 ± 1.6
CNRZ302	Cheese	ITS-St-I	<i>prtS</i> <sup>-</sup>	PrtS <sup>-</sup>	22.3 ± 0.1	30.7 ± 1.7	51.4 ± 0.7	68.9 ± 8.5
ATCC19258	Pasteurized milk	ITS-St-I	<i>prtS</i> <sup>+</sup>	PrtS <sup>+/-</sup>	22.9 ± 1.6	36.0 ± 2.9	51.8 ± 1.3	72.0 ± 1.9
ST85	Cheese	ITS-St-II	<i>prtS</i> <sup>+</sup>	PrtS <sup>+</sup>	29.4 ± 1.1	44.5 ± 1.4	56.0 ± 1.1	70.4 ± 1.4
ST80	Cheese	ITS-St-II	<i>prtS</i> <sup>+</sup>	PrtS <sup>+</sup>	34.1 ± 2.0	53.7 ± 3.0	59.4 ± 2.3	90.0 ± 0.1
ST88	Cheese	ITS-St-II	<i>prtS</i> <sup>+</sup>	PrtS <sup>+</sup>	34.4 ± 0.1	49.6 ± 0.8	61.4 ± 1.4	81.4 ± 2.8
ATE19PB8	Yoghurt	ITS-St-II	<i>prtS</i> <sup>+</sup>	PrtS <sup>+</sup>	37.1 ± 0.4	50.2 ± 0.5	61.4 ± 3.5	69.9 ± 0.7
ST87	Cheese	ITS-St-II	<i>prtS</i> <sup>+</sup>	PrtS <sup>+</sup>	37.2 ± 1.6	52.7 ± 1.5	57.9 ± 1.4	76.9 ± 0.1
PB18	Cheese	ITS-St-II	<i>prtS</i> <sup>+</sup>	PrtS <sup>+</sup>	38.4 ± 2.5	50.8 ± 2.8	64.0 ± 3.2	83.9 ± 0.8
Y4	Yoghurt	ITS-St-V	<i>prtS</i> <sup>+</sup>	PrtS <sup>+</sup>	38.5 ± 0.8	51.8 ± 2.8	59.6 ± 4.0	71.7 ± 2.3
LMD-9	Yoghurt	ITS-St-II	<i>prtS</i> <sup>+</sup>	PrtS <sup>+</sup>	43.6 ± 0.4	55.5 ± 2.3	58.5 ± 1.0	68.9 ± 0.9
4F44	Cheese	ITS-St-I	<i>prtS</i> <sup>+</sup>	PrtS <sup>+</sup>	43.6 ± 1.6	59.7 ± 3.2	63.9 ± 2.0	82.8 ± 1.4
PB302	Yoghurt	ITS-St-II	<i>prtS</i> <sup>+</sup>	PrtS <sup>+</sup>	44.2 ± 1.3	55.0 ± 1.8	52.2 ± 2.8	85.2 ± 2.3
PB385	Yoghurt	ITS-St-II	<i>prtS</i> <sup>+</sup>	PrtS <sup>+</sup>	44.4 ± 2.5	58.8 ± 1.2	63.1 ± 2.8	76.3 ± 2.6
CNRZ391	Yoghurt	ITS-St-II	<i>prtS</i> <sup>+</sup>	PrtS <sup>+</sup>	46.2 ± 0.9	58.9 ± 1.3	60.6 ± 2.5	75.5 ± 2.6

<sup>a</sup> Values represent acidity produced by *S. thermophilus* strain incubation, i.e., difference between the initial milk acidity value and the value determined after 4 or 6 h of incubation. Each measure was done in triplicate. Errors are expressed as standard deviation.

strains were grown in M17 medium (Terzaghi and Sandine, 1975) supplemented with lactose (20 g L<sup>-1</sup>), with or without urea (1 g L<sup>-1</sup>). For acidification studies, *S. thermophilus* strains were grown in reconstituted skim milk (10%, w/v) with or without bactotryptone (1%, w/v) or without flurofamide (10 µM) supplementation, the latter which is an urease inhibitor (Pernoud et al., 2004).

## 2.2. DNA extraction, restriction fragment separation and Southern analyses

For DNA extraction, *S. thermophilus* strains were cultivated for 24 h in 50 mL M17 medium. The DNA extraction was carried out as previously described (Fischer et al., 1997). The restriction enzyme EcoRI was used under the conditions recommended by the supplier (Promega, Madison, WI, USA). The DNA fragments were separated on agarose gels according to Sambrook et al. (1989). Both 1 kb and 100 bp DNA ladders (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) were used as molecular weight markers. Southern blotting, pre-hybridization and hybridization conditions were used as previously described by Demuyter et al. (1988). Labeling of probes and detection of specific hybrids were performed using the DIG (digoxigenin) DNA labeling and detection kit, under the conditions recommended by the supplier (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). An internal fragment of 4.65 kb of *prtS* gene was used as a probe. This fragment was amplified from the genomic DNA of strain LMD-9 using the primers Style 1 and Style 18 (Table 2), labelled and hybridized against EcoRI restriction digest of genomic DNA of several *S. thermophilus* strains.

## 2.3. Polymerase Chain Reaction amplifications and DNA sequencing

Sequences of the different primers used in this work are shown in Table 2. Each PCR (Polymerase Chain Reaction) was carried out in

a "My Cycler" PCR device (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) with a final volume of 50 µL and with 1.25 U of Taq DNA polymerase (Sigma, St Louis, MO, USA), 200 ng of genomic DNA, 200 µmol L<sup>-1</sup> of each dNTP and 25 µmol L<sup>-1</sup> of each primer. After a first step of denaturation over 4 min at 95 °C, the mixture was then subjected to 30 cycles of three steps of 30 s each (a denaturation step at 95 °C, an annealing step at the temperatures indicated in Table 2 and a extension step at 72 °C). A final extension at 72 °C for 10 min was carried out. Specificity of the different primers designed in this work was checked by sequencing the corresponding PCR products.

DNA sequencing was performed on double-stranded template from a PCR product by the society Genome Express (Meylan, France). A search for homology was carried out using the BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) and sequence comparisons and alignments were performed with the Bioedit software (free access, <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>) using the ClustalW algorithm.

## 2.4. Evaluation of *S. thermophilus* acidifying capacities by determination of Dornic Acidity

Titrateable acidity was determined according to the International Dairy Federation method (IDF, 1991). Dornic Acidity was measured in milk media with or without supplementation with bactotryptone or flurofamide after 2, 4 and 6 h of *S. thermophilus* incubation. Three drops of phenolphthalein solution (2% in 96% ethanol) were added to 10 mL of the milk media. The mixture was titrated with standardized NaOH (0.111 M) until the first colour change (to pink) persisted for 30 s. One more drop of NaOH (0.111 M) was added and the final volume was noted. One Dornic degree (°D) corresponds to 0.1 g of lactic acid. All experiments were carried out in triplicate. Before inoculation, the Dornic Acidity of milk with or without

**Table 2**

Sequence of primers used in this work.

Name	Sequence (5'–3')	Target sequence
ITS16S	TTGTACACACCGCCCGTCA	<i>E. coli</i> 16S rRNA <sup>a</sup> positions 1390–1408
ITS23S	GGTACCTTAGATGTTTCAGTTC	<i>E. coli</i> 23S rRNA <sup>a</sup> positions 209–189
Prt For	TACGGTGAATGGTTAAACG	+628 <sup>b</sup>
Prt Rev	AATTACTTTACTACCAACCG	+1159 <sup>b</sup>
Style 1	CCAACAACAAGGCACTATTA	-267 <sup>b</sup>
Style 2	GTTGAGTTGTTCTACTTCTGT	+322 <sup>b</sup>
Style 3	ACTAAGGTGGAAGCAACTGTT	+129 <sup>b</sup>
Style 4	ATTGTCCAGCGACTGGTTGT	+775 <sup>b</sup>
Style 5	CAGCTGGTAATGATGGAACAT	+101 <sup>b</sup>
Style 6	CCAACCTGAAAAATCTGAAAGAA	+1599 <sup>b</sup>
Style 7	CAATTCATCTGTCTTCATTC	+1465 <sup>b</sup>
Style 8	CCGTTGTTAATTGTGTTGAGT	+2056 <sup>b</sup>
Style 9	GTTTATATTTGACTGGCGAAG	+1918 <sup>b</sup>
Style 10	GTCTTGATCGCAGAGTCAG	+2492 <sup>b</sup>
Style 11	GAACCTGTTACAGCACAGC	+2374 <sup>b</sup>
Style 12	GCTGGACGAGGGTAAATG	+2966 <sup>b</sup>
Style 13	GTTCCAGGTGACAGCAGTACA	+1851 <sup>b</sup>
Style 14	ACCAAATGTAAGCTTAAAGAACG	+3387 <sup>b</sup>
Style 15	TCAGTCACCGATGAAACAGG	+3304 <sup>b</sup>
Style 16	ATAGGCAGTTTGAAGTTCTGG	+3858 <sup>b</sup>
Style 17	ACTTGCAAACCAAGTCAAATGTTA	+3723 <sup>b</sup>
Style 18	CGCTGCTCAACTGCCTGG	+4311 <sup>b</sup>
Style 19	GCAGCGAAAGCAACTTAGA	+4491 <sup>b</sup>
Style 20	TTCCTTGACGCTCGTATGC	+4749 <sup>b</sup>
Style 1-1	ACAATTCATGCCGTTCCATAAG	-864 <sup>c</sup>
Style 2-1	TTGTCGGCATCGCAAGTATAT	-65 <sup>c</sup>
Style 20-1	ATTACAGCATGTACCGATAG	+4636 <sup>c</sup>
Style 20-2	TGATCTGAGAACATAAGGGTC	+5282 <sup>c</sup>

(–) and (+) indicate if the target sequence is located upstream (–) or downstream (+) from the putative start codon.

<sup>a</sup> Accession number: U00096.2; annealing temperature: 54 °C (Kostman et al., 1992).

<sup>b</sup> *S. thermophilus* CNRZ385 *prtS* gene; accession number: AAG09771; annealing temperature: 58 °C.

<sup>c</sup> *S. thermophilus* LMD-9 *prtS* gene; accession number: YP\_820283; annealing temperature: 58 °C.

bactotrytone or flurofamide was measured to determine the initial value in milk as well as the variability of the measurement. The initial Dornic Acidity of milk was found to be  $18.5 \pm 3$  °D.

### 2.5. Protein extraction, electrophoresis, and measurement of proteolytic and urease activity

*S. thermophilus* strains were cultivated in M17 medium for 16 h at 42 °C for the measurement of proteolytic activity, or in M17 supplemented with urea, growth conditions known to strongly induce urease biogenesis in *S. thermophilus* (Mora et al., 2005), at 42 °C up to an OD<sub>650</sub> of 1.2. Bacteria were harvested by centrifugation for 15 min at 4 °C and 3900 × g. After three washes in sodium phosphate buffer (50 mM) without SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), whole-cell soluble proteins were extracted as previously described by Gonzalez-Marquez et al. (1997). To release CEP from walls, the cell debris were suspended in sodium phosphate buffer (50 mM) supplemented with 10% SDS and then disrupted by sonication (1 min at 10 W with a 50% pulse, Vibracell 600 W, Sonics and Materials, Newtown, CT, USA). Cell debris was removed by centrifugation for 15 min at 4 °C and 12,000 × g. The supernatant, corresponding to this centrifugation and containing cell wall extract, as well as the supernatant containing the whole-cell soluble proteins, were used for measurement of proteolytic activity. The protein content was measured (Bradford, 1976), using bovine serum albumin as a standard.

An SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) was performed under conditions already described (Egito et al., 2002), using broad range standard molecular mass markers (6.5, 14.4, 21.5, 31, 45, 66.2, 97.4, 116.2 and 200 kDa). Proteolytic activity was measured using casein zymography, as

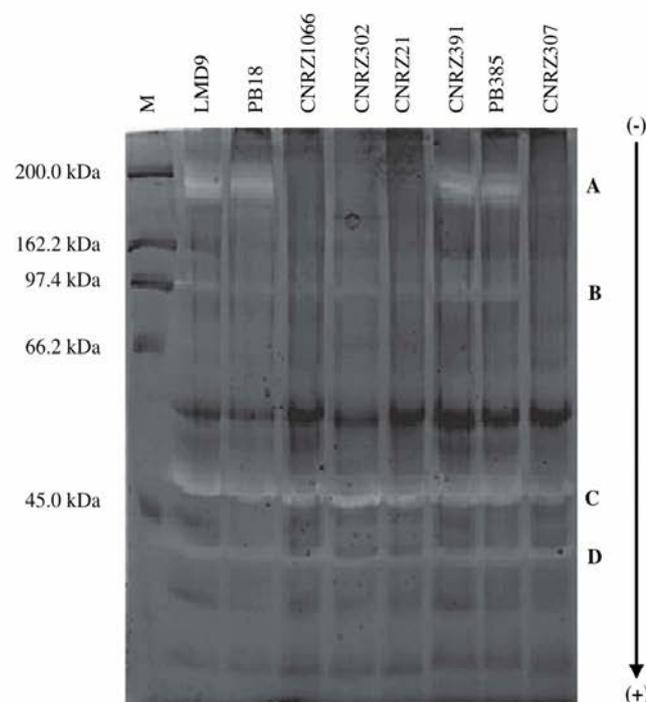
described by Raulo et al. (2002). Polyacrylamide gel (7.5%, w/v) containing SDS was co-polymerized with caseins (at a final concentration of 0.025%), samples (at least 30 µg of the whole-cell soluble proteins or at least 5 µg of proteins of the cell wall extract) were then applied in non-reducing Laemmli buffer, i.e., without β-mercaptoethanol, without heat denaturation, and run at 500 V. The gel was washed twice in 2.7% Triton-X100 for 90 min to allow enzyme renaturation and incubated in 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 (optimal pH for the enzyme activity), with 13.5 mM CaCl<sub>2</sub> and 50 mM NaCl, for 48 h at 37 °C. Caseinolytic activity was measured by immersing the gel for 2 h at room temperature in a staining solution consisting of 0.1% (w/v) Coomassie blue R250, 2% (w/v) TCA and 50% (v/v) ethanol. The gel was de-stained using a mixture of 50% methanol, 10% acetic acid and 40% water. Areas of caseinolytic activity appeared as non-stained clear bands on a dark blue background.

For the urease activity measurement, about 20 µg of proteins were prepared in 375 mM Tris-HCl buffer, pH 8.9, containing 10% (v/v) glycerol and 0.01% (w/v) bromophenol blue. Non-denaturing-PAGE separation was carried out in 9% (w/v) polyacrylamide gel containing 375 mM Tris-HCl buffer, pH 8.9. The electrode buffer (pH 8.8) consisted of 25 mM Tris-HCl containing 250 mM glycine. Thioglycolic acid was added to the cathodic running buffer at a final concentration of 100 µM. After electrophoresis, urease activity was measured as previously described by Sissons et al. (1989).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Determination of caseinolytic activity by zymography

The CEP (*PrtS*) activity was investigated by a zymographic approach using caseins as substrates. *S. thermophilus* strains were grown for 16 h at 42 °C in M17 medium, and whole-cell soluble proteins (Fig. 1) as well as cell wall proteins (data not shown) were extracted. Strain CNRZ1066 (*prtS*<sup>–</sup>) and strain LMD-9 (*prtS*<sup>+</sup>) were used as negative and



**Fig. 1.** Detection of *PrtS* activity in the soluble protein fraction by SDS-PAGE zymogram analysis under non-reducing conditions. About 30 µg of proteins were subjected to electrophoresis for each assay. Band A corresponds to *PrtS* whereas the bands B, C and D probably correspond to intracellular proteases. M: molecular mass markers.

positive controls respectively. The caseinolytic activity of PrtS could be revealed by the presence of a band with an apparent molecular mass of about 170 kDa as deduced from the *prtS* sequence (4857 nt) of *S. thermophilus* LMD-9. Only one gene encoding a protease, i.e., PrtS, with such a molecular mass is present on the genome of this strain.

A band of expected size was detected in both protein fractions – whole-cell soluble proteins (Fig. 1) and cell wall protein fractions (data not shown) – in the strain LMD-9 but not in the strain CNRZ1066. This band was also detected in both protein fractions of 15 strains (Fig. 1 and Table 1) though in three of them (CNRZ404, CNRZ445 and ATCC19258), it was slight. For all strains, the protease was detectable in the whole-cell soluble protein and in the cell wall protein fractions, or undetectable in the two kinds of fractions.

On the basis of these qualitative observations, irrespective of their origin (yoghurt or cheese), a high proportion of strains in our collection (15 out of 30) displayed a PrtS activity. Twelve were designated as PrtS<sup>+</sup> strains whereas the three that seemed to exhibit a slight activity were designated as PrtS<sup>+/-</sup>. The apparent contradiction of our results with those previously reported by Shahbal et al. (1991), who observed a small number of PrtS<sup>+</sup> strains among 97 *S. thermophilus* strains, could result from a bias in the selection of products from which the different *S. thermophilus* strains were isolated.

### 3.2. Variability of the *prtS* gene in *S. thermophilus*

To determine whether the PrtS<sup>-</sup> phenotype resulted from an absence or mutation of the *prtS* gene, its presence was investigated by PCR in the different strains and was sequenced in two opposite contexts (i.e., PrtS<sup>+</sup> and PrtS<sup>-</sup> context).

#### 3.2.1. Detection of the *prtS* gene in the different *S. thermophilus* strains

The presence or absence of the *prtS* gene was tested by amplifying a region of the gene that overlaps the domains A and H (Fig. 2), using two primers Prt For/Prt Rev (Table 2). One amplification product of the expected size (531 bp) was obtained for 22

strains as was found for strain LMD-9 used as a reference. No amplification product was obtained for the six remaining strains (ST14, CNRZ160, PB5, CNRZ21, CNRZ307 and CNRZ302) as for the *prtS* negative strain CNRZ1066 (Table 1). This result was confirmed by Southern experiments using a 4.65 kb internal fragment of *prtS* of *S. thermophilus* LMD-9 as a probe (data not shown). The sequence of eight PCR products randomly chosen (products of strains PB180, PB302, CNRZ391, PB385, 4F44, ATE19PB8, ATCC19258 and Y4) was established. Only the sequence from the strain 4F44 was identical to the corresponding *prtS* part of the strain CNRZ385 (accession number, AF243528) whereas the other seven were identical to the corresponding *prtS* part of the strain LMD-9 (accession number, YP\_820283).

#### 3.2.2. Sequencing of *prtS* gene in strains PrtS<sup>-</sup> and PrtS<sup>+</sup>

To determine whether the PrtS<sup>-</sup> phenotype of some *prtS*<sup>+</sup> strains resulted from a mutation of the corresponding gene, it was amplified, using 13 pairs of primers (Table 2), from one PrtS<sup>+</sup> strain (PB302) and four PrtS<sup>-</sup> strains (strains ATE11PB6, HAD8 $\alpha$ , PB180 and ST19), and sequenced. All of the sequences had a size of 5991 nt and appeared to be identical to that of the strain LMD-9.

All sequences consisted of an Open Reading Frame (ORF) of 4857 nt, a 752 nt sequence upstream and a 382 nt downstream from the ORF. A Ribosome Binding Site (RBS) was detected 13 nt upstream from the ATG of the ORF as well as a -10 box (TATATT), which was localized 39 nt upstream from the RBS. A codY box (AATTTTCAGAAATATA) was also present 44 nt upstream from the TATA box. Downstream from the ORF, no transcriptional terminator has been identified. The ORF shared 100% identity with the corresponding one of strain LMD-9 and about 95% identity with that of strain CNRZ385 and with a CEP of *Streptococcus suis*. As described by Fernandez-Espla et al. (2000), the PrtS sequence can be divided into seven domains: SS (signal sequence), PP (propeptide), PR (catalytic domain), A (globular domain), H (helical domain), W (cell wall domain) and AN (anchored domain). Interestingly, we observed that differences between the PrtS sequence of *S. thermophilus* strains ATE11PB6, HAD8 $\alpha$ , PB180, ST19, PB302, LMD-9,

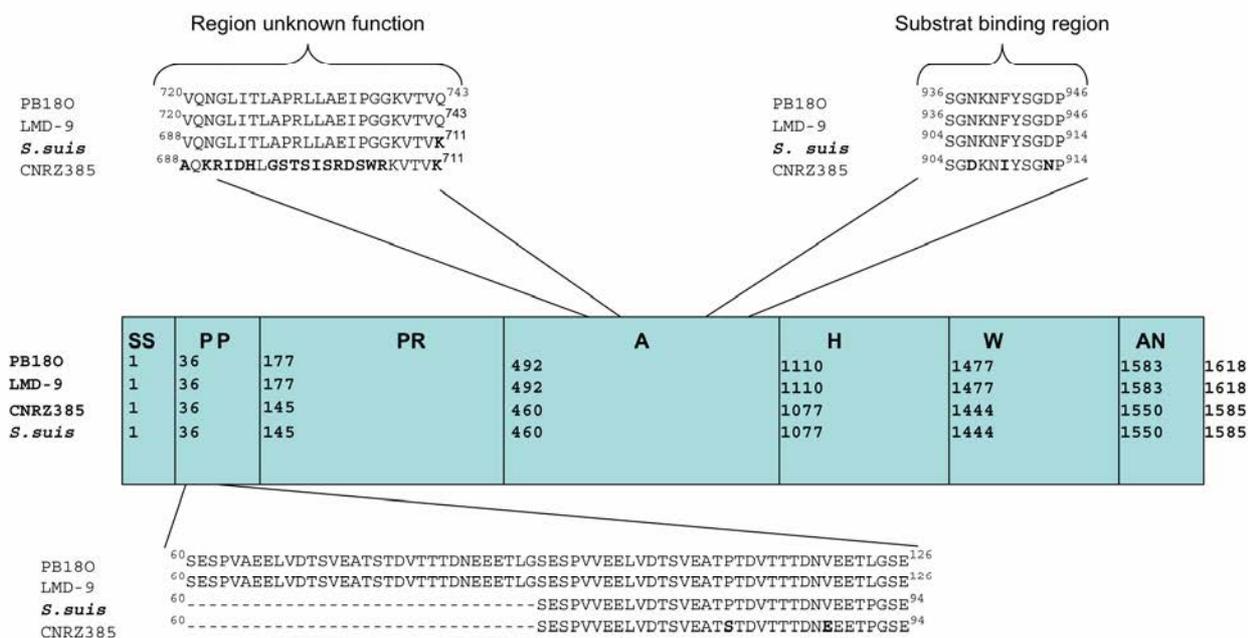


Fig. 2. Schematic representation of the PrtS structure into domains, and representation of main differences which were detected between PrtS sequences of *S. thermophilus* PB180, LMD-9 (accession number, YP\_820283), CNRZ385 (accession number, AAG09771) and *S. suis* (accession number, ZP\_00875908). SS, signal sequence; PP, propeptide; PR, catalytic domain; A, globular domain; H, helical domain; W, wall domain; AN, anchored domain (from Fernandez-Espla et al., 2000).

CNRZ385 and *S. suis* were more frequent in PP and A domains (Fig. 2). In the PP domain, sequences of *S. thermophilus* ATE11PB6, HAD8 $\alpha$ , PB180, ST19, PB302 and LMD-9 harboured a slightly imperfect duplication of a motif of 32 residues whereas it was absent from the *S. thermophilus* CNRZ385 and *S. suis* sequences (Fig. 2). We question whether such a duplication might influence the efficiency of the maturation process. In the A domain, a 24 residue sequence of unknown function strongly differed between *S. thermophilus* ATE11PB6, HAD8 $\alpha$ , PB180, ST19, PB302, LMD-9 and *S. suis* on one hand, and *S. thermophilus* CNRZ385, on the other hand (Fig. 2). Besides these differences, two substitutions located inside the segment (936–946), which has been predicted to be involved in substrate binding (Fernandez-Espla et al., 2000), were observed between *S. thermophilus* ATE11PB6, HAD8 $\alpha$ , PB180, ST19, PB302, LMD-9 and *S. suis* on one hand, and *S. thermophilus* CNRZ385 on the other hand (Fig. 2). For the first one, a negatively charged residue (Asp-906) in *S. thermophilus* CNRZ385 is replaced by an uncharged residue (Asn) in the others. The second substitution corresponds to the replacement of an isoleucyl residue (Ile-909) in *S. thermophilus* CNRZ385 by a phenylalanyl residue in the other strains.

As mentioned above, sequencing of the eight PCR products of 531 bp revealed that seven out of eight are identical to the *prtS* allele of strain LMD-9, suggesting that it is the most frequent in the *S. thermophilus* species. The presence of an imperfect duplication, which is present in the PP domain of the *prtS* allele of the strain LMD-9, was further investigated by PCR for the 23 *prtS*<sup>+</sup> strains using the primers style 3 and style 4. A band of 742 bp, corresponding to a fragment of expected size when the duplication is present, was observed for each strain, except for the strains CNRZ445 and 4F44 (data not shown). Therefore, the LMD-9 *prtS* allele is the most frequent in our collection and perhaps in the *S. thermophilus* species.

### 3.2.3. Conclusions about the variability of *prtS* in *S. thermophilus*

In contrast to the conclusions drawn from the sequencing of the two first genomes (Bolotin et al., 2004), our results suggest that in most cases, the *PrtS*<sup>-</sup> phenotype of some *S. thermophilus* strains does not result from an absence of the corresponding gene since it has been detected in 23 out of 30 strains. On the basis of the results obtained from the strains ATE11PB6, HAD8 $\alpha$ , PB180 and ST19, the *PrtS*<sup>-</sup> phenotype of the strains having the *prtS* gene might result from an alteration of its expression rather than from a mutation. Indeed, in each case, the *prtS* gene appears to be functional since no mutation was detected in an absence of the ORF or in the 752 nt upstream (containing the promoter) or in the 382 nt downstream from the ORF. Finally, it appeared that the *prtS* allele of the strain LMD-9 is the most frequent since it is detected in 21 out of 23 strains of our collection. As *PrtS* of the strains CNRZ385 and LMD-9 differed in the segment 936–946, which has been predicted to be involved in substrate binding (Fernandez-Espla et al., 2000), it would be interesting to determine whether these two CEP display the same substrate specificity.

### 3.3. The *PrtS*<sup>+</sup> strains displayed the highest acidifying capacities when grown in milk

Shahbal et al. (1991) observed that the three proteolytic strains of their collection also displayed the highest acidification rates when grown in milk. This reflects, at least in part, their growth capacity in milk which also depends on their galactose–lactose metabolism, capacity to acid stress resistance, peptide transport systems or their ureolytic activity (Garault et al., 2002; Latrille et al., 1992; Letort et al., 2002; Spinnler and Corrieu, 1989; Tinson et al., 1982). Therefore, we investigated the acidifying capacities of the strains in our collection and determined whether the differences observed resulted from their sensitivity to acid stress or from urease activity.

### 3.3.1. Different acidifying capacities of *S. thermophilus* strains grown in milk with or without bactotryptone

The acidifying activity of the 28 strains in our collection was determined after growth in milk with or without bactotryptone supplementation, and compared with that of the reference strains CNRZ1066 and LMD-9. Acidification rates were determined after 4 and 6 h of culturing at 42 °C.

After 4 and 6 h of growth in milk, three groups of strains were distinguished (Table 1). The first group included two strains CNRZ21 and CNRZ307 (designated as L-strains) that were slightly acidifying (average titratable acidity was 11.0 ± 2.4 °D after 6 h incubation), a second group contained 16 strains (designated as M-strains) displaying an intermediate level of acidification rate (titratable acidity after 6 h incubation ranged between 22.8 and 36.0 °D; mean of 29.8 ± 4.2) and a third group corresponding to 12 strains (designated as H-strains) with a high acidification rate (titratable acidity after 6 h incubation ranged between 44.5 and 58.9 °D; mean of 53.4 ± 4.5). The average pH of the cultures for the three groups was 6.3 ± 0.1, 5.6 ± 0.3 and 5.0 ± 0.2 after 4 h incubation, and of 6.0 ± 0.0, 5.3 ± 0.2 and 4.7 ± 0.1 for the L-, M- and H-strains after 6 h incubation, respectively. Interestingly, all H-strains were *PrtS*<sup>+</sup> whereas all L- and M-strains were either *PrtS*<sup>-</sup> or *PrtS*<sup>+/-</sup>.

Although H-strains seemed to be globally more acidifying after 4 and 6 h incubation in milk supplemented with bactotryptone, the different *S. thermophilus* strains displayed similar acidification rates (Table 1). For example, after 6 h incubation, acidifying capacities of strains CNRZ307 (L-strain) and CNRZ404 (M-strain) appeared to be similar to those of strains CNRZ308 (M-strain) and PB302 (H-strain), respectively (Table 1). Finally, pH values of culture media after 6 h were not significantly different (about 4.5 ± 0.2), showing that all of strains displayed similar levels of resistance to acid stress.

### 3.3.2. Urease activity of the H-strains

We determined whether the differences in acidifying capacities observed between the L-, M-strains and the H-strains might result from the ureolytic activity of the H-strains since the metabolism of urea is known to interfere with the acidifying capacities of *S. thermophilus*. The H-strains and the two controls LMD-9 (positive control) and CNRZ407 (negative control, as it was devoid of urease; Juillard et al., 1988) were grown at 42 °C in milk with or without flurofamide (10 µM) supplementation, an urease inhibitor. At this concentration, it has been shown that flurofamide does not inhibit *S. thermophilus* growth (Pernoud et al., 2004). The initial acidity of milk supplemented with flurofamide did not significantly differ from that of milk (data not shown). The acidification rate of strain CNRZ407 after 4 h or 6 h incubation was not significantly different in the presence (30.9 ± 1.2 after 6 h incubation) or in the absence (31.2 ± 1.8 after 6 h incubation) of flurofamide, whereas that of strain LMD-9 was slightly lower (52.5 ± 1.6) after 6 h incubation, suggesting that urease inhibition affects acidity production as already reported (Pernoud et al., 2004). All of the H-strains, except strain Y4 (51.9 ± 0.7 after 6 h incubation), appeared to be less acidifying in presence of flurofamide (between 35.9 ± 1.2 and 54.0 ± 1.7 after 6 h incubation) but remained more acidifying than the L- and M-strains (Table 1). Thus, ureolytic activity does not appear to be the only determining factor of the high acidifying capacities of the H-strains. The presence or absence of active urease was investigated in the strain Y4 as well as in the two controls by a zymographic approach. Urease activity was detected in strains LMD-9 and Y4 but not in the negative control CNRZ407, as expected (data not shown). The absence of a detectable effect of flurofamide on the acidifying capacities of strain Y4 might result from an absence of urease biogenesis in milk or from an absence of sensitivity of its urease to flurofamide at the concentration employed.

### 3.3.3. Acidifying capacities of the different *S. thermophilus* strains

On the basis of their acidifying capacities, strains in our collection were clustered into three groups: L-, M- and H-strains. The high acidifying capacities of the H-strains did not result from a higher sensitivity of the L- and M-strains to acid stress, nor from the urease activity of the H-strains. As Shahbal et al. (1991) reported, we observed that all of the H-strains were also PrtS<sup>+</sup>, underlining the strong impact of the proteolytic capacities on the acidifying capacities.

### 3.4. Detection of three types of 16S-23S ITS among the 30 *S. thermophilus* strains

To investigate phylogenetic relationships between PrtS<sup>+</sup>, PrtS<sup>+/-</sup> and PrtS<sup>-</sup> strains, their ITS 16S-23S were amplified and sequenced, except that of strains CNRZ1066 and LMD-9, which are already known. The primers ITS16S and ITS23S (Table 2) which target 153 bp from the 3' end of the 16S rRNA gene and 201 bp from the 5' end of the 23S rRNA gene were used. For each strain, a 0.6 kb band was observed, suggesting the presence of a unique type of 16S-23S ITS, as previously described (Moschetti et al., 1998; Tilsala-Timisjarvi and Alatosava, 1997). The sequence of this band was established for each strain and revealed the presence of a 16S-23S ITS of 273 or 274 bp. Three different types of 16S-23S ITS were observed (Table 1). The first two corresponded to ITS-St-I and ITS-St-II whereas the third (ITS-St-V) corresponded to a new allele that has never been reported (accession number, EU375896). It showed high similarities with the ITS-St-I sequence except in position 264, where a G264A substitution was detected. This substitution is present in *Streptococcus salivarius* ATCC13419 and eliminates one of the two HaeIII restriction sites that were used by Moschetti et al. (1998) to differentiate *S. thermophilus* from *S. salivarius*. This G264A substitution has been previously reported by Mora et al. (2003) for ITS-St-IV type.

As Mora et al. (2003) reported, we also observed that most strains harboured an ITS-St-I (17 out of 30) or an ITS-St-II (10 out of 30) allele while only three exhibited an ITS-St-V allele. Interestingly, all of the strains (10 out of 10) with an ITS-St-II allele were PrtS<sup>+</sup> as well as being high acidifying, whereas all, except one (strain 4F44), with an ITS-St-I allele were PrtS<sup>+/-</sup> or PrtS<sup>-</sup> and belong to the L- or M-clusters. Such results showed a strong phylogenetic proximity between the H-/PrtS<sup>+</sup> strains.

## 4. Conclusions

The aim of this work was to address three questions which could be raised from results published earlier. The first one concerned the reason for the low or absent CEP activity observed in some strains. We showed that, in our collection of strains isolated from yoghurt or cheeses, a large proportion of strains (15 out of 30) appeared to be PrtS<sup>+</sup> (12 out of 15) or PrtS<sup>+/-</sup> (3 out of 15). No correlation between the origin and the proteolytic capacities of the strains could be drawn. In most cases, the PrtS<sup>-</sup> phenotype did not result from the absence of the corresponding gene as in the two strains (LMG18311 and CNRZ1066) where the genome has been sequenced, but perhaps rather from an alteration of its expression as in the case of the strains ATE11PB6, HAD8 $\alpha$ , PB180 and ST19. The second question concerned the variability of the *prtS* gene in the *S. thermophilus* species. We showed that most of the strains (21 out of 23) of our collection, irrespective of their origin, possessed the same *prtS* allele of the LMD-9 strain. Likewise, we showed that the PrtS<sup>+</sup> strains also exhibited the highest acidifying capacities. Finally, the third question concerned the phylogenetic proximity existing between strains with different proteolytic and acidifying potentials. We showed that all of the strains having a 16S-23S ITS of type II also displayed high proteolytic and acidifying properties, suggesting that they have a high phylogenetic proximity.

## Acknowledgments

This work was supported by "Le Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche".

## References

- 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., Burteau, S., Boutry, M., Delcour, J., Goffeau, A., Hols, P., 2004. Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nature Biotechnology* 22, 1523–1524.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.
- Demuyter, P., Leblond, P., Decaris, B., Simonet, J.M., 1988. Characterization of two families of spontaneously amplifiable units of DNA in *Streptomyces ambofaciens*. *Journal of General Microbiology* 134, 2001–2007.
- Egito, A.S., Miclo, L., Lopez, C., Adam, A., Girardet, J.M., Gaillard, J.L., 2002. Separation and characterization of mares' milk alpha(s1)-, beta-, kappa-caseins, gamma-casein-like, and proteose peptone component 5-like peptides. *Journal of Dairy Science* 85, 697–706.
- Fernandez-España, M.D., Garault, P., Monnet, V., Rul, F., 2000. *Streptococcus thermophilus* cell wall-anchored proteinase: release, purification, and biochemical and genetic characterization. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4772–4778.
- Fischer, G., Decaris, B., Leblond, P., 1997. Occurrence of deletions, associated with genetic instability in *Streptomyces ambofaciens*, is independent of the linearity of the chromosomal DNA. *Journal of Bacteriology* 179, 4553–4558.
- Garault, P., Le Bars, D., Besset, C., Monnet, V., 2002. Three oligopeptide-binding proteins are involved in the oligopeptide transport of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Biological Chemistry* 277, 32–39.
- Gilbert, C., Atlan, D., Blanc, B., Portailier, R., Germond, J.E., Lapiere, L., Mollet, B., 1996. A new cell surface proteinase: sequencing and analysis of the PrtB from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Journal of Bacteriology* 178, 3059–3065.
- Gonzalez-Marquez, H., Perrin, C., Bracqart, P., Guimont, C., Linden, G., 1997. A 16 kDa protein family overexpressed by *Streptococcus thermophilus* PB18 in acid environments. *Microbiology* 143, 1587–1594.
- IDF, 1991. Yoghurt determination of titratable acidity, Potentiometric method. IDF Standard 150. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
- Juillard, V., Desmazeaud, M.J., Spinnler, H.E., 1988. Mise en évidence d'une activité uréasique chez *Streptococcus thermophilus*. *Canadian Journal of Microbiology* 34, 818–822.
- Kostman, J.R., Edlind, T.D., LiPuma, J.J., Stull, T.L., 1992. Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. *Journal of Clinical Microbiology* 30, 2084–2087.
- Latrille, E., Picque, D., Perret, B., Corrieu, G., 1992. Characterizing acidification kinetics by measuring pH and electrical conductivity in batch thermophilic lactic fermentations. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 74, 32–38.
- Letort, C., Nardi, M., Garault, P., Monnet, V., Juillard, V., 2002. Casein utilization by *Streptococcus thermophilus* results in a diauxic growth in milk. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 3162–3165.
- Mora, D., Monnet, C., Parini, C., Guglielmetti, S., Mariani, A., Pintus, P., Molinari, F., Daffonchio, D., Manachini, P.L., 2005. Urease biogenesis in *Streptococcus thermophilus*. *Research in Microbiology* 156, 897–903.
- Mora, D., Ricci, G., Guglielmetti, S., Daffonchio, D., Fortina, M.G., 2003. 16S-23S rRNA intergenic spacer region sequence variation in *Streptococcus thermophilus* and related dairy streptococci and development of a multiplex ITS-SSCP analysis for their identification. *Microbiology* 149, 807–813.
- Moschetti, G., Blaiotta, G., Aponte, M., Catzeddu, P., Villani, F., Deiana, P., Coppola, S., 1998. Random amplified polymorphic DNA and amplified ribosomal DNA spacer polymorphism: powerful methods to differentiate *Streptococcus thermophilus* strains. *Journal of Applied Microbiology* 85, 25–36.
- 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. *Journal of Bacteriology* 181, 4592–4597.
- Pernoud, S., Fremaux, C., Sepulchre, A., Corrieu, G., Monnet, C., 2004. Effect of the metabolism of urea on the acidifying activity of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Dairy Science* 87, 550–555.
- Raulo, S.M., Sorsa, T., Tervahartiala, T., Latvanen, T., Pirila, E., Hirvonen, J., Maisi, P., 2002. Increase in milk metalloproteinase activity and vascular permeability in bovine endotoxin-induced and naturally occurring *Escherichia coli* mastitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 85, 137–145.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Savijoki, K., Ingmer, H., Varmanen, P., 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71, 394–406.
- Shahbal, S., Hemme, D., Desmazeaud, M., 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., Hemme, D., Renault, P., 1993. Characterization of a cell envelope-associated proteinase activity from *Streptococcus thermophilus* H-strains. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 177–182.

- Sissons, C.H., Loong, P.C., Hancock, E.M., Cutress, T.W., 1989. Electrophoretic analysis of ureases in *Streptococcus salivarius* and in saliva. *Oral Microbiology and Immunology* 4, 211–218.
- Spinner, H.E., Corrieu, G., 1989. Automatic method to quantify starter activity based on pH measurement. *Journal of Dairy Research* 56, 755–764.
- Terzaghi, B.E., Sandine, W.R., 1975. Improved medium for *Lactic streptococci* and their bacteriophages. *Applied Microbiology* 29, 807–813.
- Tilsala-Timisjarvi, A., Alatossava, T., 1997. Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *International Journal of Food Microbiology* 35, 49–56.
- Tinson, W., Broome, M.C., Hillier, A.J., Jago, G.R., 1982. Metabolism of *Streptococcus thermophilus*. 2. Production of CO<sub>2</sub> and NH<sub>3</sub> from urea. *Australian Journal of Dairy Technology* 37, 14–16.



## **Chapitre 2**

## Chapitre 2 : Publication n°2

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

#### **Résumé :**

Jusqu'à présent, la seule protéase (CEP pour Cell Envelope Proteinase) caractérisée chez *Streptococcus thermophilus* est la protéase PrtS. Il semble que cette protéase est ancrée à la paroi cellulaire, par la sortase A (SrtA), grâce au motif LPXTG présent à son extrémité C-terminale. Deux protéases solubles correspondant aux deux formes pro-enzyme et mature de la protéase PrtS ont été détectées dans le surnageant de la souche 4F44. Ainsi, la protéase PrtS de cette souche présente 60% de son activité sous forme pariétale et 40% sous forme libre. Sa sécrétion dans le milieu de culture pourrait résulter d'un déficit partiel de la sortase SrtA de la souche 4F44 même si la séquence soit semblable à celle de la souche LMD-9 pour laquelle la protéase PrtS est ancrée à la paroi cellulaire. En effet, la présence d'un motif LPXTG intacte à l'extrémité C-terminale des protéases libérées a montré que l'ancrage par la sortase SrtA n'a pas eu lieu et ces protéases n'ont pas été libérées par la protéolyse après leur ancrage.

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

Oun Ki Chang<sup>§</sup>, Clarisse Perrin<sup>§</sup>, Wessam Galia, Franck Saulnier, Laurent Miclo, Emeline Roux, Alain Driou, Gérard Humbert and Annie Dary \*

**\*corresponding author. Tel.: +33 383684267, Fax: +33 383684274; email: [Annie.Dary@sbiol.uhp-nancy.fr](mailto:Annie.Dary@sbiol.uhp-nancy.fr)**

UR AFPA (Unité de Recherche « Animal & Fonctionnalités des Produits Animaux »), Équipe PB2P (Protéolyse & Biofonctionnalités des Protéines et des Peptides), Nancy-Université, Faculté des Sciences et Technologies, B.P. 70239. 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France.

**(<sup>§</sup>) both authors contributed equally to this work**

### **Abstract**

PrtS is the sole cell envelope protease (CEP) characterized today in *Streptococcus thermophilus*. It is believed that it is anchored to the cell wall by the sortase A (SrtA) thanks to the LPXTG motif, present at its C-terminus. Two soluble proteases corresponding to PrtS in its proenzyme and mature form were detected in the supernatant of the strain 4F44. In this strain, 60% of the PrtS molecules are anchored to the cell wall and 40% released in the medium. Such a release might result from a partial deficiency in the strain 4F44 of SrtA, even if its sequence slightly differs from that of the strain LMD-9, where prtS is anchored. Indeed, the presence of an intact LPXTG motif at the C-terminus of the released proteases showed that the linking process driven by SrtA did not occur and these proteases were not released by proteolysis after their anchoring.

**Keywords: *Streptococcus thermophilus*, Cell Envelope Proteinase, PrtS, Sortase A**

## Introduction

In dairy industry, a rapid growth of the lactic acid bacteria (LAB) used as starters, such as *Streptococcus thermophilus*, allows a rapid acidification of milk. Because of their auxotrophy for several amino acids, this rapid growth and acidification, is dependent on the capacity of LAB to find milk peptides or free amino acids that can be utilized for their protein synthesis. Thus, growth of most of *S. thermophilus* strains is stimulated by supplementing the growth medium with two to five amino acids while the *Lactobacilli* require between 3 and 14 amino acids in their growth medium (Courtin, Monnet & Rul, 2002). As the concentration in peptides or in free amino acids is low in milk, LAB depends on the presence of cell envelope protease (CEP), at the surface of their cells. For example, growth of a PrtP-negative mutant of *Lactococcus lactis* is strongly altered in milk, since it reaches only 10 % of the cell density observed with a PrtP-positive strain (Thomas & Mills, 1981). Similarly, the biomass of a PrtB<sup>-</sup> mutant of *Lactobacillus bulgaricus* grown in milk, reaches only 22 % of that obtained with a PrtB<sup>+</sup> strain (Gilbert, Blanc, Frot-Coutaz, Portalier, & Atlan, 1997). Although several LAB possess only one CEP, the presence of two or more CEP has been reported in *Lb. helveticus* (Genay, Sadat, Gagnaire, & Lortal, 2009). As for the other LAB, the utilization of caseins as amino acids source by *S. thermophilus* depends from its CEP PrtS which is the sole CEP known today in this LAB (Fernandez-Espla, Garault, Monnet, & Rul, 2000). Oligopeptides are then transported into the bacteria by oligopeptide transport system (Garault, Le Bars, Besset, & Monnet, 2002) and hydrolyzed by a pool of various intracellular peptidases to provide amino acids to the cell (Rul & Monnet, 1997). As for the other LAB cited above, the absence of an active PrtS in a mutant PrtS<sup>-</sup> reduced its growth in milk while it is similar to that of a PrtS<sup>+</sup> strain in M17. (Courtin, Monnet & Rul, 2002; Galia, Perrin, Genay, & Dary, 2009).

The protease PrtS of *S. thermophilus* CNRZ385 has been characterized at the biochemical and genetic level. It is a serine protease belonging to the subtilisin-like serine protease family also known as the subtilase family whose the activity is enhanced in the presence of the divalent cations Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> (Fernandez-Espla, Garault, Monnet, & Rul, 2000; Shahbal, Hemme, & Renault, 1993). PrtS is synthesized as a preprotease and displays several domains, a signal sequence (SS), a propeptide (PP), a catalytic domain (PR), a globular domain (A), an helical domain (H), a wall domain (W) and an anchored domain (AN) which contains a LPNTG motif (Fernandez-Espla, Garault, Monnet, & Rul, 2000; Siezen, 1999). During its exportation, the signal sequence is removed and PrtS is secreted as a

protease (immature form) and matured (cleavage of the PP domain) through an unknown mechanism. In pathogenic *Streptococci*, proteins having a LPXTG motif are often involved in virulence and are anchored to the cell wall by the sortase A, SrtA (Davies, Svensäter, & Herzberg, 2009; Egan, Kurian, Ward, Hunt, & Leigh, 2010; Lalioui *et al.*, 2005; Yamaguchi *et al.*, 2006). As this motif is present in PrtS, it has been proposed that PrtS could be also covalently bound to wall peptidoglycan by SrtA (Fernandez-Espla, Garault, Monnet, & Rul, 2000). The facts that no protease activity was detected in the cell-free medium after growth of *S. thermophilus* (Shahbal, Hemme, & Renault, 1993), and that various treatments (chemical, mechanical and enzymatic) have been needed to release the protease from cellular debris of the *S. thermophilus* CNRZ385 (Fernandez-Espla, Garault, Monnet, & Rul, 2000; Shahbal, Hemme, & Renault, 1993) support this hypothesis. The anchoring of proteins with a LPXTG motif by SrtA is a two step process. In the first, SrtA cleaves the bond linking the threonin to the glycine residue of the LPXTG motif, and in the second step, SrtA covalently attaches the protein to the peptidoglycan through its cysteine transpeptidase activity. In numerous pathogenic *Streptococci* such as *S. pneumoniae* (Kharat & Tomasz, 2003), *S. gordonii* (Davies, Svensäter, & Herzberg, 2009), *S. mutans* (Igarashi, Asaga, & Goto, 2003) or *S. suis* (Wang *et al.*, 2009), inactivation of the *srtA* gene leads to the failure of the anchoring in the peptidoglycan of proteins with a LPXTG motif and to their release into the extracellular medium.

In this paper, we reported the highlight of a soluble extracellular form of PrtS in *S. thermophilus* 4F44 and explored the reasons of such a release in the growth medium. Analysis of the sortase SrtA of this strain revealed that it might be partially defective even if its sequence slightly differs from that of the strain LMD-9, whose the CEP PrtS is anchored. Indeed, the presence of an intact LPXTG motif in the C-terminal region of the released protease forms showed that the anchoring process did not occur correctly, and that these proteases were not released by proteolysis after their anchoring.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Bacterial strains and growth conditions*

*S. thermophilus* strains used in this work (Table 1) were isolated in our laboratory either from cheese or yoghurt, or came from the CNRZ (Centre National de Recherches Zootechniques, INRA, Jouy-en-Josas, France) or ATCC (American Type Culture Collection,

Manassas, VA, USA) collections. Strains were stored at -80 °C in reconstituted skim milk (10 %, w/v). Before each experiment, strains were grown at 42 °C overnight in skim milk or in LM17 medium, corresponding to M17 medium (Terzaghi & Sandine, 1975) supplemented with lactose (20 g/L). For DNA extraction or proteolytic activity detection, strains were grown in LM17 medium. The growth was followed by measuring optical density OD<sub>650</sub> and/or monitoring pH of culture supernatant.

## 2.2. Protein extraction, electrophoresis and detection of protease and peptidase activities

Intracellular proteins (IP) were extracted from *S. thermophilus* cells, grown in LM17 at 42 °C as previously described (Galia, Perrin, Genay, & Dary, 2009). Proteins released (RP) in the culture medium during growth of *S. thermophilus* were recovered after filtration of the culture supernatant through a 0.22 µm filter.

SDS-PAGE was performed as previously described (Egito *et al.*, 2002), using a 5 % stacking and 7.5 % resolving polyacrylamide gel. Before electrophoresis, protein concentration of samples was determined by the Bradford method (Bradford, 1976). About 20 µg of protein were usually loaded.

Protease activity was detected either by zymography using caseins as substrates, under the conditions already described (Galia, Perrin, Genay, & Dary, 2009) or by using the substrate Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, prepared in 1 volume of dimethyl formamide and 9 volumes of 50 mmol/L Tris-HCl buffer (pH 8) containing 5 mmol/L CaCl<sub>2</sub>. Peptidase activity was detected using the Lys-pNA chromogenic substrate, prepared as the Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA substrate. For both substrates, 100 µL sample (containing bacteria or not) were mixed with 1 mL of substrate solution and incubated 1 h at 37 °C. Absorbance (A<sub>410</sub>) was determined by spectrometry (Uvikon, Kontron, Switzerland). Samples without bacteria were previously desalted and concentrated 5 fold using microcon filter (cut off 50 kDa).

## 2.3. Preparation of a fraction enriched in extracellular PrtS soluble forms

*S. thermophilus* 4F44 was grown at 42 °C in LM17 medium, initially inoculated at 1 %. At an OD<sub>650</sub> of 2, cells were harvested by centrifugation at 3900 g for 15 min at 20 °C and placed in 800 mL of LM17 fresh medium. Hence, bacteria were grown until the pH of the

culture medium reaches a value of 4.6. The soluble immature (PrtS with its prodomain PP) and mature (PrtS without its prodomain PP) forms of PrtS precipitated in these acidic conditions (see result section). So, the culture medium was discarded after 15 minutes of a 12000g centrifugation at 4 °C and the pellet, containing both cells and precipitated proteins, were washed 2 times in 50 mmol/L acetate buffer pH 4.6 and resuspended in 50 mmol/L Tris-HCl buffer pH 8. As at this pH, immature and mature form of PrtS were solubilized (see result section), bacterium cells were discarded after a centrifugation for 15 min at 3900 g and the supernatant filtered through a 0.22 µm filter, dialyzed against deionized water and lyophilized.

#### *2.4. Blotting and N-terminal sequencing*

After separation of proteins by SDS-PAGE, proteins were electrotransferred onto polyvinylidene difluoride membrane (PVDF) and stained with 0.2 % (w/v) Ponceau S red in 2 % (v/v) acetic acid. Destaining was performed with ultra-pure H<sub>2</sub>O. After excision of the bands of interest, the protease was submitted to amino-terminal microsequencing by Edman degradation (González-Márquez, Perrin, Bracquart, Guimont, & Linden, 1997). Identification of the corresponding proteins was performed using BLAST program for protein sequencing (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

#### *2.5. Characterization of the C-terminal part of PrtS by bottom-up approaches using high resolution Electrospray Ionization with Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry (ESI-FT-ICR-MS)*

These analyses were performed in the Laboratoire de Spectrométrie de Masse Biologique & Protéomique of ESPCI-ParisTech (École Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles de la Ville de Paris, France). Proteins present in the fraction enriched in the PrtS soluble forms were separated by SDS-PAGE and the two bands corresponding to the immature and mature form of PrtS were cut out and conserved in 200 µL of 1 % acetic acid at -20 °C. The proteins present in the cut band and corresponding to the immature form of PrtS were digested with trypsin and the generated peptides identified by bottom-up approach (Yates, Ruse, Nakorchevsky, & 2009). Peptides were applied to an UltiMate® 3000 Nano LC system (Dionex, Amsterdam, Netherlands) coupled to a hybrid linear quadrupole ion trap Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer (LTQ-FT; Thermofisher, San

Jose, CA, USA) equipped with an electrospray ionization source. The raw sample (8  $\mu$ L injected) was desalted and preconcentrated by a PepMap C<sub>18</sub> precolumn (5 x 0.3 mm i.d., 3  $\mu$ m particle size, 10 nm pore size, Dionex) before eluting and separating on a reversed phase analytical column (PepMap C<sub>18</sub>, 150 x 0.075 mm i.d., 3  $\mu$ m particle size, 10 nm pore size, Dionex). For this elution, solvent A was composed of 2 % acetonitrile and 0.1 % formic acid in water and solvent B of 90 % of acetonitrile and 0.1 % of formic acid in water. The gradient used was as follows: a isocratic step of 1 % of solvent B in solvent A during 5 min at a flow rate of 15  $\mu$ L/min for desalting, a second isocratic step of 5% of solvent B in solvent A for 3 min at a flow rate of 300 nL/min and a linear gradient of 5 % to 25 % of solvent B in solvent A during 32 min at a flow rate of 220 nL/min. Data has been acquired in the LTQ-FT with automatic alternation between MS and MS/MS modes according to (Hesse, Marcelo, Rossier, & Vinh, 2008), with a modified m/z range of 400-2000.

Peptide identification was performed as previously described (Hesse, Marcelo, Rossier, & Vinh, 2008). Mass accuracy tolerance was set to 10 ppm in MS mode, and 0.1 Da in MS/MS mode. Data was processed using Mascot 2.2 software (Matrix Science Inc., Boston, MA, USA) and searched against the deduced amino acid sequence of the *prtS* gene of the strain *S. thermophilus* 4F44. Two missed cleavages were allowed for trypsin and fixed modifications such as carbamidomethylation of cysteine residues, oxidation of methionine residues, deamidation of glutamine and asparagine residues, formylation, phosphorylation of serine, threonine and tyrosine residues, methylation and ethylation. Protein identification was validated if at least two different protein fragments were identified with a minimal peptide score of 30 according to the published standards (Kapp *et al.*, 2005).

## 2.6. DNA extraction -restriction fragment separation and Southern analysis - Polymerase chain reaction (PCR) amplication - DNA sequencing and nucleotide accession numbers

DNA extractions were realized as previously described (Galia, Perrin, Genay, & Dary, 2009). The different primers sequences used in this work are shown in Table 2. Each PCR was carried out in a final volume of 50  $\mu$ l, with 1.25 U of Taq DNA polymerase, 200 ng of genomic DNA, 200  $\mu$ mol/L of each dNTP and 25  $\mu$ mol/L of each primer. Amplification of *prtS* gene was performed in the following conditions: 4 min of denaturation at 95 °C, 30 cycles of three steps of 30 s (denaturation step at 95 °C, annealing step at 58 °C, extension

step at 72 °C), final extension step at 72 °C for 10 min. Amplification of the *srtA* gene was performed under the same conditions, except for the 30 cycles of three steps since the denaturation step was performed 45 s at 95 °C, the annealing step at 55 °C for 30 s and the extension step for 45 s at 72 °C.

DNA sequencing was performed on double-stranded template from a PCR product by Beckman Coulter Genomics (Takeley, UK). The search for homology and sequence comparison were performed using the BLAST program (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) and the Bioedit software (free access, <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>) using the ClustalW algorithm, respectively. The sequence of the genes *prtS* and *srtA* of *S. thermophilus* 4F44 have been deposited in the GenBank database under accession numbers: GU459009 and GU459010, respectively.

### 3. Results

#### 3.1. Highlight of an extracellular protease in the strain 4F44

In a previous work, we showed a direct link between high acidifying capacities and the expression of the protease PrtS which is the sole CEP which has been identified in *S. thermophilus*. Thus, we observed that among the 30 *S. thermophilus* strains of different origin of our collection, 23 strains possess the *prtS* gene but only 15 express it and display high acidifying capacities in milk (Galia, Perrin, Genay, & Dary, 2009). We completed here this work by seeking in the culture supernatant of these strains the presence of putative extracellular soluble proteolytic activity.

After 5 h growth at 42 °C in LM17 medium, the putative proteins released in the medium (RP for Released Proteins) were collected from filtered supernatant, and caseinolytic activities were sought by zymography, using caseins as substrates (Table 1). Although no caseinolytic activity was detected in 14 out the 15 strains tested (Table 1), two caseinolysis plaques, corresponding to proteases of apparent molecular mass of about 170 and 154 kDa were detected in the RP fraction of the strain 4F44 (Fig. 1a). To ensure that these protease activities did not result from cell lysis, peptidase and protease activities were studied in the IP (Intracellular Proteins) and RP fractions obtained after 5 h growth of strains 4F44 and PB385, the latter strain was used as control (Table 1). The two chromogenic substrates, Lys-pNA and Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, allowed the detection of peptidase and protease activity

respectively. The peptidase activity was detected in the IP fraction of both strains but not in the RP fraction. The protease activity was only observed in the IP fraction of the strain PB385 whereas it was detected in both fractions in the strain 4F44. Therefore, these results allowed us to conclude that the presence of a caseinolytic activity in the RP fraction of the strain 4F44 did not result from a lysis of cells, but rather from a release of proteases into the extracellular medium.

### *3.2. Immature and mature form of PrtS corresponded to the extracellular soluble proteases detected in the strain 4F44*

Release of extracellular proteases of the strain 4F44 was followed during its growth in LM17. Every 30 minutes, protease activity using the chromogenic substrate Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA was measured in the filtered supernatant. Proteolytic activity increased during 3.5 h of growth and then, rapidly decreased (Fig. 1b). Simultaneously, the pH reached a 4.5 value. This loss of activity could result either from the protease precipitation at their isoelectric point, or from their inactivation by the acidic conditions. Hence, the strain 4F44 was grown until the pH of the culture reached 4.6, and the cells and the putative proteases recovered and resuspended in a 50 mmol/L Tris-HCl buffer pH 8 to solubilize the putative proteases. Cells were then discarded and the supernatant recovered and filtered. In this supernatant, protease activity was detected at a level which appeared to be similar to that observed at pH 6. Consequently, we used this property to retrieve significant quantities of extracellular proteases. Eight hundred milliliters of dialyzed supernatant containing the enzymes were lyophilized and 25 % of the lyophilized material was used to separate proteases by SDS-PAGE. After transfer onto a PVDF membrane and staining with Ponceau S Red, two distinct bands corresponding to proteins having an apparent molecular mass of 170 and 154 kDa were detected.

The N-terminal sequence of proteins respectively present in the caseinolysis band 1 (170 kDa) and 2 (154 kDa) were determined. Ten amino acid residues were resolved in each case. The ten amino acid residues of the protein in the plaque 2 corresponded to those of the N-terminal part of the mature form of PrtS (Fig. 2) purified from the strain CNRZ385 (Fernandez-Espla, Garault, Monnet, & Rul, 2000). Indeed, during exportation and maturation processes of PrtS, the signal peptide and prodomain are removed. The ten amino acid residues

of the protein in plaque 1 were identical to the first ten amino acid residues of the prodomain of PrtS, *i.e.* the immature form of PrtS (Fig. 2).

These results implied that, in the strain 4F44, PrtS could be anchored and released into the medium. To test this hypothesis, the strains LMD9 and 4F44 were grown until they reached exponential phase. More precisely, the cultures were stopped when the pH of the medium reached 5.8, *i.e.*, when a maximal protease activity was observed (Fig. 1b). Cells were then recovered by centrifugation, washed and re-suspended in an appropriate 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7). Protease activity was sought using the Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA substrate. In the strain LMD-9, protease activity was only detected with the bacterial suspension. On the contrary, about 40 % of protease activity was detected in the culture medium of the strain 4F44 (released protease) and 60 % in the bacterial suspension (anchored protease). In addition, no proteolytic activity was detected in the supernatant of a sample of bacterial suspension of the strains LMD-9 and 4F44 stored during 1 h 30 min in 50 mmol/L Tris-HCl buffer (pH 8) containing 5 mmol/L CaCl<sub>2</sub> or not. Therefore, this result implied that the PrtS molecules that were attached to the peptidoglycan were not released.

Knowing that only one copy of the *prtS* gene has been previously detected in the strain 4F44 (Galia, Perrin, Genay, & Dary, 2009), we determined whether the PrtS release resulted from a mutation in its gene, most particularly in the anchor region (AN). Hence, the *prtS* gene was amplified, using 13 pairs of primers (Table 2), and sequenced. A 5957 bp sequence was obtained. It shared 99% identity with the corresponding gene of strains CNRZ385 and LMD-9. It consisted of an Open Reading Frame (ORF) of 4755 nt, and regions 766 nt upstream and 371 nt downstream from the ORF. A Ribosome Binding Site (RBS) was detected 13 nt upstream from the ATG of the ORF as well as a -10 box (TATATT), which was localized 39 bp upstream from RBS. A cod Y box (AATTTTCAGAATATA) was also present 44 nt upstream from the TATA box. Downstream from the ORF, no transcriptional terminator was identified. The ORF shared 98 % identity with the corresponding gene in strain CNRZ385, 97 % identity with that of the strain LMD-9 and with a CEP of *S. suis* 89/1591 and 96 % with PrtS of the strain JIM8232. The imperfect duplication of a motif of 32 residues observed in the PP domain of *S. thermophilus* LMD-9 (Delorme, Bartholini, Bolotine, Dusko Ehrlich, & Renault 2010; Galia, Perrin, Genay, & Dary, 2009) was absent in this allele, as in the case of the strain CNRZ385 (Fernandez-Espla, Garault, Monnet, & Rul, 2000). The major differences which were observed between PrtS of the strains CNRZ385 and 4F44 were located between the positions 721 and 739 (Fig. 2). This difference results from two frameshift mutations, one

(+1, addition of an adenine) at the position 2072 and the other (-1, loss of a thymine) at the position 2121 in the allele of the strain CNRZ385. Using the expasy software to compute pI/Mw ([http://www.expasy.ch/cgi-bin/pi\\_tool](http://www.expasy.ch/cgi-bin/pi_tool)) molecular mass and isoelectric point of the immature and mature PrtS forms of the strains 4F44 were evaluated. If the estimated molecular weight (154 kDa) of the mature form of PrtS was identical with that of the strain LMD-9, the theoretical molecular mass of the proprotease PrtS of the strain 4F44 was slightly less (165.9 kDa) than that of the strain LMD-9 (169.5 kDa), estimated with the same software. This difference results from the absence of the duplication which is present in the prodomain of PrtS of the strain LMD-9 (Fig. 2). The isoelectric points of the immature and mature PrtS form were respectively 4.42 and 4.53, explaining their precipitation when the pH dropped below 5. As the AN region appeared to be identical to that of the *prtS* allele present in the databanks, it was concluded that the PrtS release by the strain 4F44 did not result from a mutation in this region.

### 3.3. The *srtA* gene of the strain 4F44 displayed mutations

As PrtS of *S. thermophilus* exhibits a LPXTG motif (LPNTG in this case), it has been assumed that it is anchored to the cell wall by SrtA (Fernandez-Espla, Garault, Monnet, & Rul, 2000). Several observations supporting this hypothesis have been reported in the introduction. Further, we detected no protease activity in the supernatant, after 1 h 30 min incubation of the strains 4F44 and LMD-9 in presence or not of CaCl<sub>2</sub>, showing that the fraction of PrtS that was anchored to the cell wall was not released.

We obtained the sequence of *srtA*, the only gene of sortase detected in the genome of *S. thermophilus*, in the strain 4F44 to determine whether the released PrtS resulted from a mutation in this gene. The *srtA* gene was amplified from genomic DNA of the strain 4F44 using two pairs of primers (Table 2) and sequenced. The sequence of *srtA* consisted of an Open Reading Frame (ORF) of 759 nt (253 amino acid residues). No promoter was detected upstream from the ATG but it should be noted that in other *Streptococci*, *srtA* is included in operonic structure comprising at least the gene *gyrA*, encoding the subunit A of the gyrase. The deduced SrtA protein of the strain 4F44 shared 99 and 98 % identity with the corresponding homologs of the strains ND03 and LMD-9. The catalytic triad (H146, C212, R220) and the residues of the active site (G118, K130, S142, A144, T211, A217) were found to be present (Fig. 3). Five and 3 substitutions were observed between the SrtA sequence of

the strain 4F44 and that of the strains LMD-9 and ND03, respectively (Fig. 3). To determine whether the *srtA* allele of the strain 4F44 existed in strains having or not having a PrtS anchored in their cell wall, the *strA* gene of the strains PB180, PB302 and CNRZ307 was amplified as before and sequenced. It must be noted that the strain CNRZ307 is *prtS*<sup>-</sup> while the two others possess this gene but it was found to be only expressed in the strain PB302 (Table 1). We observed that the three strains exhibited a *strA* allele identical with that of the strain LMD-9.

### 3.4. Determination of the C-terminus sequence of the extracellular soluble form of PrtS

In Streptococci, the anchoring by SrtA of proteins having a LPXTG motif to the cell wall proceeds in two steps: cleavage of the link between the threonine and the glycine residues within the LPXTG motif, and attachment of the protein to the peptidoglycan.

To determine the reason for the release of PrtS in the growth medium of the strain 4F44, 75 % of lyophilized material recovered from 800 mL of supernatant culture medium (see above) was separated on SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. A band containing the protein corresponding to the immature PrtS form was cut and the protein was subjected to a tryptic digestion. We applied a bottom-up approach (Yates, Ruse, Nakorchevsky, & 2009) with ESI-FT-ICR-MS to analyze the peptides generated after tryptic hydrolysis. This mass spectrometry has been adapted to obtain high accuracy and reliability of results (Douglas, Frank, & Mao, 2005; Yates, 2004; Yates, Ruse, Nakorchevsky, & 2009)

Considering the specificity of trypsin and the detection window, all of the expected peptides with molecular weight ranging between 700 Da and 3800 Da were observed. The sequence coverage is 69 % with a Mascot score of 7094. The tryptic peptide <sup>1580</sup>QVTQLPNTGENDTK<sup>1593</sup> containing the motif LPNTG was found as well as the peptide <sup>1580</sup>QVTQLPNTGENDTKYYLVPGVIIGLGTLLVSIRR<sup>1613</sup> with two trypsin miscleavages. Thus, SrtA has not hydrolyzed the peptide bond between the threonine and glycine residues of the LPNTG motif (Fig. 2).

## 4. Discussion

PrtS is the sole CEP known in *S. thermophilus* (Fernandez-Espola, Garault, Monnet, & Rul, 2000). On the basis of the results reported (Shahbal, Hemme, & Desmazeaud, 1991), it

has been long believed that most of *S. thermophilus* strains did not contain any CEP and that their growth in milk depended on their co-cultivation during the manufacture of fermented dairy products with other bacteria such as *Lb. bulgaricus* (Courtin, Monnet & Rul, 2002). Indeed, out of the 97 strains from the INRA collection, only 3 were found to display levels of proteolytic activity which appeared to be similar to those observed in *Lactococci* (Shahbal, Hemme, & Desmazeaud, 1991). However, whole-genome hybridization showed that 35 of 47 strains from a collection of industrial strains contained the *prtS* gene (Rasmussen *et al.*, 2008), and we also observed that among the 30 strains of our laboratory collection, 23 possessed this gene (Galia, Perrin, Genay, & Dary, 2009). Nevertheless possessing the *prtS* gene is not sufficient for its expression. Indeed, out the 23 *prtS*<sup>+</sup> strains in our collection, only 15 were found to express it under the tested conditions. The sequencing of four alleles from four *prtS*<sup>+</sup>*PrtS*<sup>-</sup> strains, did not allow detecting a mutation that can explain its lack of expression (Galia, Perrin, Genay, & Dary, 2009). Finally, analysis of distribution of the *prtS* gene in *S. thermophilus* showed that the gene is infrequent in historical collections but frequent in recent industrial ones and has been acquired from *S. suis* by horizontal gene movement (Delorme, Bartholini, Bolotine, Dusko Ehrlich, & Renault 2010).

The strain 4F44 was the sole strain where a caseinolytic activity was detected in the RP fraction, consisting of two bands corresponding to proteases of 170 and 154 kDa. We showed that the corresponding proteases are the immature and mature forms of *PrtS*, respectively. Two hypotheses could explain this result. The first implies a lysis of at least a fraction of the cells during growth and therefore, the release of intracellular proteases or peptidases in the growth medium. The second implies the effective release of *PrtS* in the extracellular medium. To test these hypotheses, two chromogenic substrates permitting the detection of peptidase and protease activity were used. A peptidase activity was detected among the proteins of the intracellular fraction of the strain 4F44, but not among the proteins of the extracellular fraction. Conversely, the protease activity was detected in both fractions, as expected. Consequently, the presence of *PrtS* in the growth medium did not result from any lysis but from its release into the medium.

The strain 4F44 contains only one copy of *prtS* gene (Galia, Perrin, Genay, & Dary, 2009). It displays 99% identity with that of strain CNRZ385. The major difference between these two alleles results from two frameshift mutations in the allele of the strain CNRZ385 (+1, addition of an adenine and -1, loss of a thymine). As in *S. suis* and *S. thermophilus* CNRZ385, the prodomain of *PrtS* of the strain 4F44 does not contain the imperfect duplication of a motif of 32 residues which is present in *PrtS* of *S. thermophilus* JIM8332 and

LMD-9 (Fig. 2), and which has been proposed to be required to direct correct folding of PrtS in its new host (Delorme, Bartholini, Bolotine, Dusko Ehrlich, & Renault 2010).

Despite absence of mutation in the AN region of PrtS, anchoring of about 40% of PrtS to the cell wall failed in the strain 4F44. We showed that the C-terminus of the soluble extracellular form of PrtS harboured an intact LPNTG motif. Consequently, the cleavage of the bond located between the threonine and the glycine of the LPNTG motif by SrtA, and the subsequent anchoring of PrtS to the cell wall did not correctly occur. Several hypotheses can be proposed to explain such a result. A first implies a release of PrtS, initially correctly anchored, by an autoproteolytic activity, as described in several LAB such as *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581 (Espeche-Turbay, De Giori, & Hebert, 2009), *Lc. lactis* Wg2; *Lc. lactis* SK11 or *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ACA-DC 178 (Kunji, 1996; Tsakalidou, Anastasiou, Vandenberghe, Van Beeumen, & Kalantzopoulos, 1999). Such a hypothesis seems unlikely since after incubation of the cells during 1 h 30 in a Tris-HCl buffer in presence or in absence of ions  $Ca^{2+}$ , no PrtS activity has been observed in the supernatant. Such an observation is consistent with the absence of the B domain, as postulated previously (Fernandez-Esplá, Garault, Monnet, & Rul, 2000). Indeed, it has been observed that several CEP of LAB are capable to be released from the cells by autoproteolysis, whose site is probably located in the B domain of these CEP. Further, the presence at the C-terminus of an intact LPXTG motif is not consistent with this hypothesis. A second hypothesis implies a partial deficiency of the sortase SrtA of the strain 4F44. To our knowledge, five types of anchors have been described in LAB (Leenhouts, Buist, & Kok, 1999): transmembrane anchor, lipoprotein anchor, AcmA repeat anchor, surface layer protein anchor and LPXTG anchor. SrtA is the sole sortase identified in the 4 strains whose the genome has been sequenced. Anchoring of proteins by SrtA depends on the presence of a signal peptide and of a LPXTG motif, followed by a C-terminal hydrophobic region and a tail of charged amino acid residues. Generally, attachment to the peptidoglycan occurs after secretion of the substrate protein by the sec pathway and cleavage of the signal sequence (Egan, Kurian, Ward, Hunt, & Leigh, 2010). On the basis of the sequence of the gene *prtS*, the signal sequence and the AN region of PrtS of the strain 4F44 are intact implying that the release of this protein in the extracellular medium does not result from an alteration of these two domains. Moreover, the signal sequence was absent from the immature and mature forms of PrtS released in the growth medium. In *Staphylococcus aureus*, hydrophobic and positively charged residues of the anchoring domain retain the protein A (a cell wall protein) within the plasma membrane until the substrate is anchored by sortase. Thus, if SrtA is mutated, the

protease can remain associated with the cell membrane. Conversely, mutations that remove or substitute residues within the LPXTG motif abolish the linkage of the protein A via the sortase (Schneewind, Model, & Fischetti, 1992; Ton-That, Marraffini, & Schneewind, 2004). The situation is different in several *Streptococci*. In these bacteria, the anchoring and surface displaying of surface proteins like the C5a peptidase (homologous of PrtS) are released after deletion of the *srtA* gene (Davies, Svensäter, & Herzberg, 2009; Igarashi, Asaga, & Goto, 2003; Lalioui *et al.*, 2005; Marraffini, Dedent, & Schneewind, 2006; Nobbs *et al.*, 2007). When compared with that of the strain LMD-9, the deduced sequence of SrtA of the strain 4F44 displays 5 substitutions. One of them (replacement of an isoleucin by a valin at the position 227) affects a residue which has been proposed to be involved in the LPXTG motif recognition (Race *et al.* 2009). As shown in Fig. 3, the I227 residue (residue numbering correspond to that of *S. downei*) is conserved in the SrtA sequence of several *Streptococcus* species which display virulence factors, which are anchored through a LPXTG motif at their surface. Only SrtA of *S. thermophilus* ND03 possess an isoleucin at this position. Nevertheless, this strain does not contain the *prtS* gene. Finally, a third hypothesis, but more complicated, hypothesis to explain the release of PrtS in the extracellular medium of the strain 4F44 implies a deficiency of both maturation and anchoring of the protease. Indeed, if the two soluble forms of PrtS which have been observed in the extracellular medium of the strain 4F44 did not contain the signal peptide, showing that the secretion of PrtS and the concomitant cleavage of the signal sequence have occurred, the presence of a mature and immature form of PrtS implies that the maturation of the protease was not correctly achieved. In *S. pyogenes*, it has been shown that the maturation and the correct exportation of the protease SpeB, a cystein protease, need the product of *ropA* gene, encoding a peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase (PPIase) named trigger factor (Lyon & Caparon, 2003). In a mutant *ropA*<sup>-</sup>, the protease is not secreted while in a mutant where the central part of *ropA* has been deleted in phase, the protease SpeB is secreted but not correctly matured, showing that maturation and secretion are linked. It has been proposed that during the translation of *speB* message, the trigger factor which is bound to the ribosome, binds to the nascent polypeptide and catalyzes through its central domain the isomerization of the peptide bond preceding a prolyl residue, located at the position 78 in the prodomain. Such an isomerization is thought to be essential for stabilizing the preprotease in a secretion-competent conformation targeted to the sec pathway. Knowing that proteins with propyl-peptidyl isomerase domain are present in the four sequenced genomes of *S. thermophilus*, the maturation of proteins like PrtS might require

such an activity, and its partial deficiency might lead to an imperfect conformation affecting the maturation and perhaps the correct anchoring of PrtS by SrtA too.

## 5. Conclusion

This work reports for the first time, the presence of an extracellular soluble form of PrtS in *S. thermophilus*. Whatever the mechanism by which PrtS is released in the extracellular medium of the strain 4F44 could impact the techno- or biofunctional properties of the final products.

## References

- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Courtin, P., Monnet, V., & Rul, F. 2002. Cell-wall proteinases PrtS and PrtB have a different role in *Streptococcus thermophilus*/*Lactobacillus bulgaricus* mixed cultures in milk. *Microbiology*, 148, 3413-3421.
- Davies, J., Svensäter, G., & Herzberg, M. 2009. Identification of novel LPXTG-linked surface proteins from *Streptococcus gordonii*. *Microbiology*, 155, 1977-1988.
- Delorme, C., Bartholini, C., Bolotine, A., Dusko Ehrlich, S., & Renault, P. 2010. Emergence of a cell wall protease in the *Streptococcus thermophilus* population. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 451-460.
- Douglas, D., Frank, A., & Mao, D. 2005. Linear ion traps in mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 24, 1-29.
- Egan, S., Kurian, D., Ward, P., Hunt, & L., Leigh, J. 2010. Identification of sortase A (SrtA) substrates in *Streptococcus uberis*: Evidence for an additional hexapeptide (LPXXXD) sorting motif. *Journal of Proteome Research*, 9, 1088-1095.
- Egito, A., Mielo, L., López, C., Adam, A., Girardet, J., & Gaillard, J.-L. 2002. Separation and characterization of mares' milk  $\alpha$ s1-,  $\beta$ -,  $\kappa$ -caseins,  $\gamma$ -casein-like, and proteose peptone component 5-like peptides. *Journal of Dairy Science*, 85, 697-706.
- Espeche-Turbay, M., De Giori, G., & Hebert, E. 2009. Release of the cell-envelope-associated proteinase of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *lactis* CRL 581 is dependent upon pH and temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 8607-8611.
- Fernandez-Espla, M., Garault, P., Monnet, V., & Rul, F. 2000. *Streptococcus thermophilus* cell wall-anchored proteinase: Release, purification, and biochemical and genetic

- characterization. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4772-4778.
- Fox, P., & Wallace, J. 1997. Formation of flavor compounds in cheese. *Advances in Applied Microbiology*, 45, 17-85.
- Gagnaire, V., Mollé, D., Herrouin, M., & Léonil, J. 2001. Peptides identified during Emmental cheese ripening: Origin and proteolytic systems involved. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4402-4413.
- Galia, W., Perrin, C., Genay, M., & Dary, A. 2009. Variability and molecular typing of *Streptococcus thermophilus* strains displaying different proteolytic and acidifying properties. *International Dairy Journal*, 19, 89-95.
- Garault, P., Le Bars, D., Besset, C., & Monnet, V. 2002. Three oligopeptide-binding proteins are involved in the oligopeptide transport of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 32-39.
- Genay, M., Sadat, L., Gagnaire, V., & Lortal, S. 2009. PrtH2, Not prtH, Is the ubiquitous cell wall proteinase gene in *Lactobacillus helveticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 3238-3249.
- Gilbert, C., Blanc, B., Frot-Coutaz, J., Portalier, R., & Atlan, D. 1997. Comparison of cell surface proteinase activities within the *Lactobacillus* genus. *Journal of Dairy Research*, 64, 561-571.
- González-Márquez, H., Perrin, C., Bracquart, P., Guimont, C., & Linden, G. 1997. A 16 kDa protein family overexpressed by *Streptococcus thermophilus* PB18 in acid environments. *Microbiology*, 143, 1587-1594.
- Hebert, E., Mamone, G., Picariello, G., Raya, R., Savoy, G., Ferranti, P., & Addeo, F. 2008. Characterization of the pattern of  $\alpha$ 1- and  $\beta$ -casein breakdown and release of a bioactive peptide by a cell envelope proteinase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 3682-3689.
- Hesse, A., Marcelo, P., Rossier, J., & Vinh, J. 2008. Simple and universal tool to remove on-line impurities in mono- or two-dimensional liquid chromatography-mass spectrometry analysis. *Journal of Chromatography A*, 1189, 175-182.
- Igarashi, T., Asaga, E., & Goto, N. 2003. The sortase of *Streptococcus mutans* mediates cell wall anchoring of a surface protein antigen. *Oral Microbiology and Immunology*, 18, 266-269.
- Kapp, E., Schütz, F., Connolly, L., Chakel, J., Meza, J., Miller, C., Fenyó, D., Eng, J., Adkins, J., Omenn, G., & Simpson, R. 2005. An evaluation, comparison, and accurate benchmarking of several publicly available MS/MS search algorithms: Sensitivity and

- specificity analysis. *Proteomics*, 5, 3475-3490.
- Kharat, A., & 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. *Infection and Immunity*, 71, 2758-2765.
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. 2006. Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16, 945-960.
- Kunji, E., 1996. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 70, 187-221.
- Lalioui, L., Pellegrini, E., Dramsi, S., Baptista, M., Bourgeois, N., Doucet-Populaire, F., Rusniok, C., Zouine, M., Glaser, P., Kunst, F., Poyart, C., & 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. *Infection and Immunity*, 73, 3342-3350.
- Leenhouts, K., Buist, G., & Kok, J. 1999. Anchoring of proteins to lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 76, 367-376.
- Lyon, W.R., & Caparon, M.G. 2003. Trigger Factor-Mediated Prolyl Isomerization Influences Maturation of the *Streptococcus pyogenes* Cysteine Protease. *Journal of Bacteriology*, 185, 3661-3667.
- Marraffini, L.A., Dedent, A.C., & Schneewind, O. 2006. Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70, 192-221.
- Nobbs, A.H., Vajna, R.M., Johnson, J.R., Zhang, Y., Erlandsen, S.L., Oli, M.W., Kreth, J., Brady, L.J., & Herzberg, M.C. 2007. Consequences of a sortase A mutation in *Streptococcus gordonii*. *Microbiology*, 153, 4088-4097.
- 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., & Banfield, M.J. 2009. Crystal Structure of *Streptococcus pyogenes* Sortase A: implications for sortase mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 6924-6933.
- Rasmussen, T., Danielsen, M., Valina, O., Garrigues, C., Johansen, E., & Pedersen, M. 2008. *Streptococcus thermophilus* core genome: Comparative genome hybridization study of 47 strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 4703-4710.
- Rul, F., & Monnet, V. 1997. Presence of additional peptidases in *Streptococcus thermophilus* CNRZ 302 compared to *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Microbiology*, 82, 695-

- Schneewind, O., Model, P., & Fischetti, V. 1992. Sorting of protein A to the staphylococcal cell wall. *Cell*, 70, 267-281.
- Shahbal, S., Hemme, D., & Desmazeaud, M. 1991. High cell wall-associated proteinase activity of some *Streptococcus thermophilus* strains (H-strains) correlated with a high acidification rate in milk. *Le Lait*, 71, 7.
- Shahbal, S., Hemme, D., & Renault, P. 1993. Characterization of a cell envelope-associated proteinase activity from *Streptococcus thermophilus* H-strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 177-182.
- Siezen, R., 1999. Multi-domain, cell-envelope proteinases of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 76, 139-155.
- Terzaghi, B. E., & Sandine, W. R. 1975. Improved medium for Lactic streptococci and their bacteriophages. *Journal of Applied Microbiology*, 29, 807-813.
- Thomas, B., & Mills, O. 1981. Proteolytic enzymes of starter bacteria. *Netherland Milk and Dairy Journal*, 35, 255-273.
- Ton-That, H., Marraffini, L.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., Vandenberghe, I., Van Beeumen, J., & Kalantzopoulos, G. 1999. Cell-wall-bound proteinase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ACA-DC 178: Characterization and specificity for  $\beta$ -casein. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 2035-2040.
- 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., & Tang, J. 2009. The involvement of sortase A in high virulence of STSS-causing *Streptococcus suis* serotype 2. *Archives of Microbiology*, 191, 23-33.
- Yamaguchi, M., Terao, Y., Ogawa, T., Takahashi, T., Hamada, S., & Kawabata, S. 2006. Role of *Streptococcus sanguinis* sortase A in bacterial colonization. *Microbes and Infection*, 8, 2791-2796.
- 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., & Nakorchevsky, A. 2009. Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 11, 49-79.

## Figure Captions

Figure 1. Detection of extracellular proteolytic activity of *S. thermophilus* 4F44 in the LM17 medium by SDS-PAGE zymogram analysis (a) and by using a chromogenic substrate (b).

a. RP: released proteins. M: molecular mass standard. The positions of the protease of 170, 154 are indicated with an arrow.

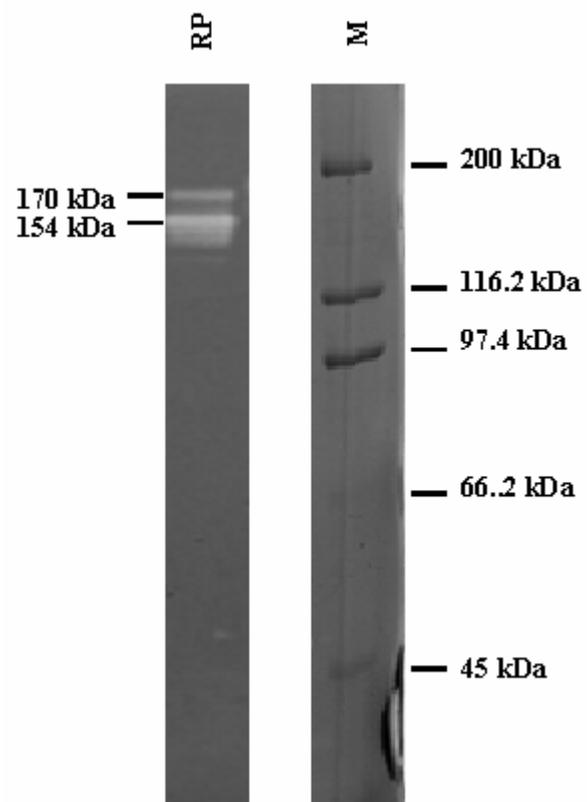
b. Proteolytic activity (expressed in Arbitrary Units) was determined during the growth of the strain 4F44 using the chromogenic substrate Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA. The growth of the strain 4F44 was followed by measuring the pH of culture medium.

Figure 2. Alignment of different parts of the protease PrtS of *S. thermophilus* 4F44 (accession number GenBank: ADB77872.1), CNRZ385 (accession number GenBank: AAG09771.1), LMD-9 (accession number NCBI Reference Sequence: YP\_820283.1), Jim 8232 (GenBank: ACL98068.1) and of *S. suis* (accession number NCBI Reference Sequence: ZP\_03625833.1). (\_\_\_\_): Signal sequence (position 1 to 35); (.....) Propeptide (position 36 to 144 for the strains CNRZ385 and 4F44, and 36 to 176 for the strains LMD-9 and JIM8232); (\_\_\_\_\_ ) Mature protease (position 145 to 1585 for the strains CNRZ385 and 4F44 , and 177 to 1618 for the strains LMD-9 and JIM8232).

Figure 3. Alignment of the sequence of SrtA of *S. thermophilus* 4f44 (gb ADB77873.1), *S. thermophilus* LMD-9 (gb ADQ63270.1), *S. thermophilus* ND03 (gb ABJ66440.1), *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 (ref YP\_002996626.1), *S. equi* subsp. *equi* 4047 (ref YP\_002746474.1), *S. sobrinus* (dbj BAG82878.1), *S. mutans* NN2025 (ref YP\_003484846.1), *S. gallolyticus* UCN34 (ref YP\_003429737.1), *S. ferus* (dbjBAI50581.1), *S. suis* (dbjBAC56211.1), *S. criceti* (dbjBAI50579.1) and *S. uberis* 0140J (ref YP\_002562210.1). Substitutions existing between SrtA of strains 4F44 and LMD9 are indicated in bold characters. Substitutions existing between SrtA of strains 4F44 and NDO3 are indicated in boxed characters. The residues which belong to the active site are underlined in light gray while those belonging to the catalytic triad in dark gray. The residues which have been proposed to be important for recognition of the LPXTG motif (Race *et al.*, 2009) are indicated by one point. One of them, the residue 227, which differs between the SrtA sequence of the strain 4F44 and that of the strain LMD9 and other Streptococci is also indicated in boxed characters and highlighted in gray. Residue numbering corresponds to that of *S. downei*

Figure 1

1a



1b

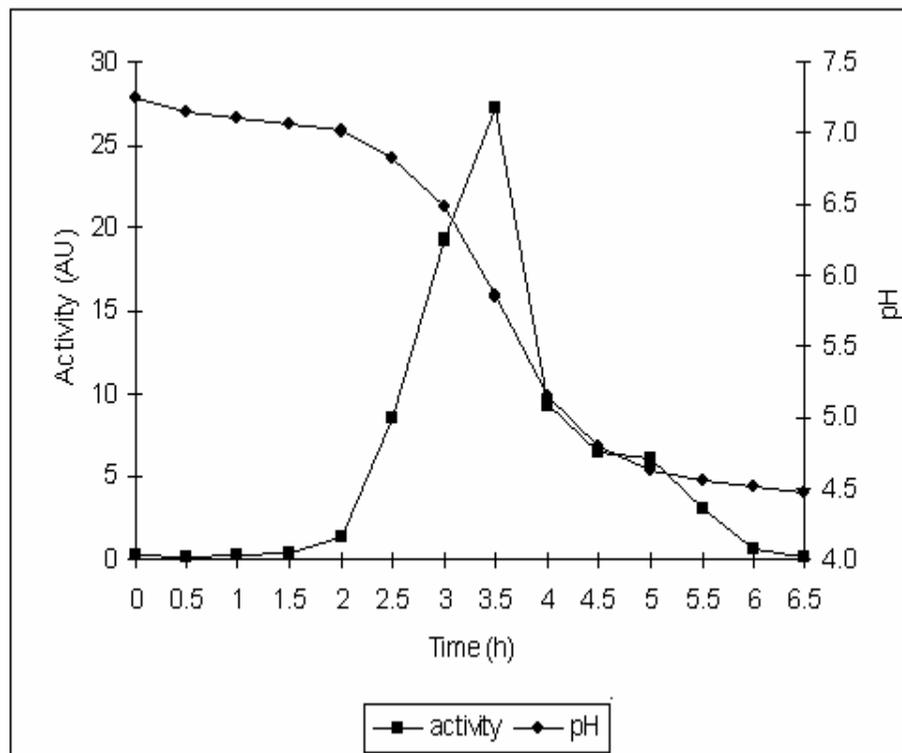




Figure 3

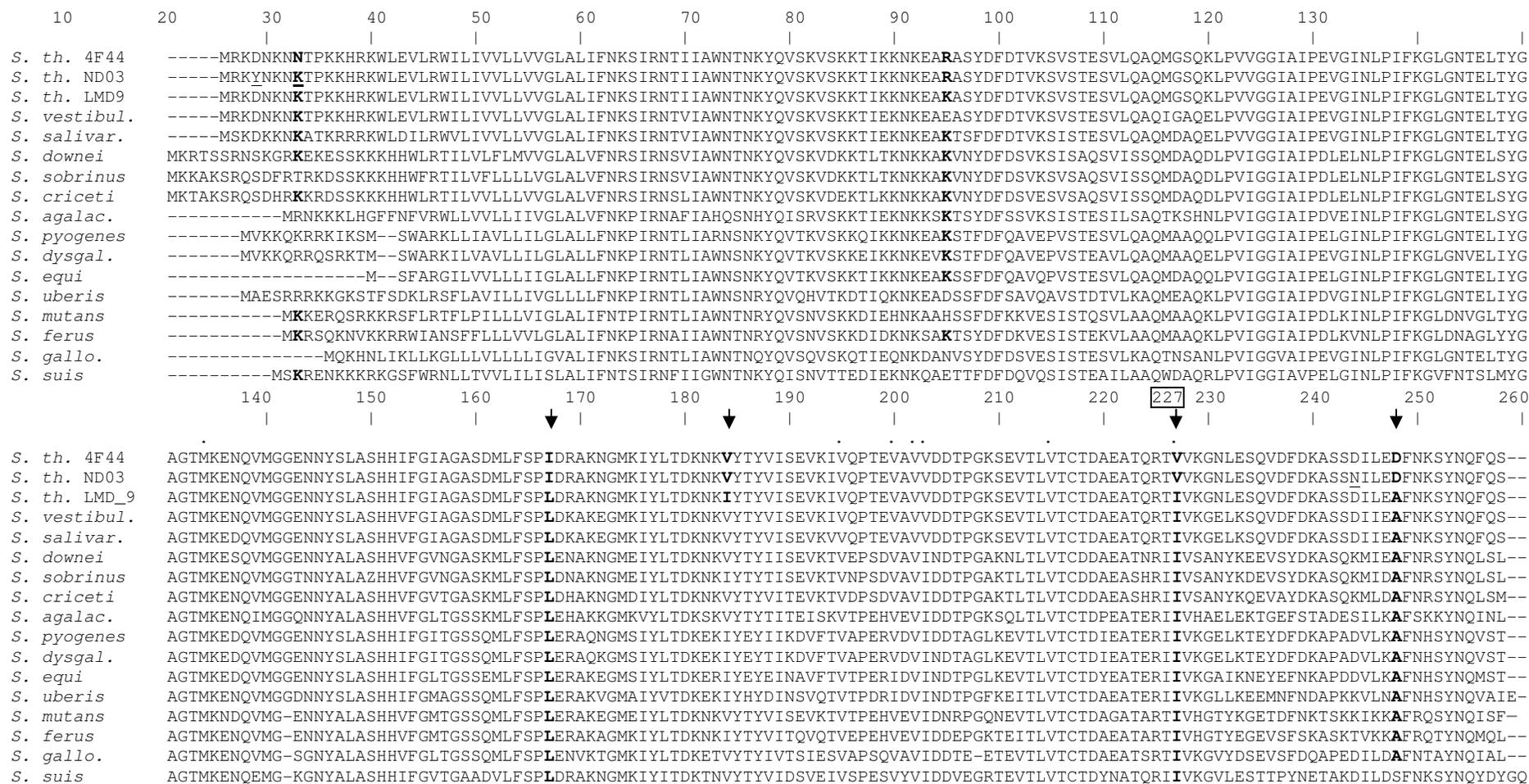


Table 1. Characteristics of *S. thermophilus* strains used in this work.

<i>S. thermophilus</i> strains	origin	Presence (+) or absence of the <i>priS</i> gene (Galia <i>et al.</i> , 2009)	Presence (+) or absence (-) of a proteolytic activity in the Released Protein (RP) fraction (This work)	Type of <i>priS</i> allele present in the strain
<b>L-strains</b>				
CNRZ21	Yoghurt	-	-	
CNRZ307	Cheese	-	-	
<b>M-strains</b>				
CNRZ1066	Yoghurt	-	-	
PB18O	Cheese	+	-	LMD-9
ATE11PB6	Yoghurt	+	-	LMD-9
ST19	Yoghurt	+	-	LMD-9
PB5	Yoghurt	-	-	
HAD8 $\alpha$	Yoghurt	+	-	LMD-9
CNRZ445	Cheese	+	-	ND
ST20	Yoghurt	+	-	ND
CNRZ160	Yoghurt	-	-	
ST14	Yoghurt	-	-	
CNRZ407	Yoghurt	+	-	ND
CNRZ404	Yoghurt	+	-	ND
HAD17	Yoghurt	+	-	ND
CNRZ308	Cheese	+	-	ND
CNRZ302	Cheese	-	-	
ATCC19258	pasteurized milk	+	-	ND
<b>H-strains</b>				
ST85	Cheese	+	-	ND
ST80	Cheese	+	-	ND
ST88	Cheese	+	-	ND
ATE19PB8	Yoghurt	+	-	ND
ST87	Cheese	+	-	ND
PB18	Cheese	+	-	ND
Y4	Yoghurt	+	-	ND
LMD-9	Yoghurt	+	-	LMD-9
4F44	Cheese	+	+	4F44 (This work)
PB302	Yoghurt	+	-	LMD-9
PB385	Yoghurt	+	-	LMD-9
CNRZ391	Yoghurt	+	-	ND

L-, M- and H- strains designate strains having Low, Medium and High acidifying capacities in milk, respectively (Galia, Perrin, Genay, & Dary, 2009). The type of *priS* allele which is present in the strains PB18O, ATE11PB6, ST19, HAD8 $\alpha$ , PB302 and PB385 was previously determined (Galia, Perrin, Genay, & Dary, 2009). ND : No Determined.

Table 2. Primers used in this work

Primer	Sequence (5'-3')	Target gene	Annealing Temperature	Source
Prt For	TACGGTGAATGGTTTAACG	<i>priS</i>	58°C	(Galia <i>et al.</i> , 2009)
Prt Rev	AATTACTTTACTACCAACCG			
Style 1	CCAACAACAAGGCACTCATTA			
Style 2	GTTGAGTTGTTTCTACTTCTGT			
Style 3	ACTAAGGTGGAAGCAACTGTT			
Style 4	ATTGTCCAGCGACTGGTTGT			
Style 5	CAGCTGGTAATGATGGAACAT			
Style 6	CCAACCTGAAAAATCTGAAAGAA			
Style 7	CAATTCCATCTGTCTTCATTC			
Style 8	CCGTTGTTAATTGTGTTGAGT			
Style 9	GTTTATATTTGACTGGCGAAG			
Style 10	GTCTTGATCGCAGAGTCAG			
Style 11	GAACCTGTTACAGCACAGC			
Style 12	GCTGGACGAGGGTTAAATG			
Style 13	GTTCCAGGTGCAGCAGTACA			
Style 14	ACCAAATGGTAGCTTAAGAACG			
Style 15	TCAGTCACCGATGAAACAGG			
Style 16	ATAGGCAGTTTGAAGTTCTGG			
Style 17	ACTTGCAAACCAGTCAAATGTTA			
Style 18	CGCTGCTTCAACTGCCTGG			
Style 19	GCAGCGAAAGCCAACCTAGA			
Style 20	TTCCTTGTGACGTCGTATGC			
Style 1-1	ACAAATTCATGCCGTTTCATAAG			
Style 1-2	TTGTCGGCATCGCAAGTATAT			
Style 20-1	ATTCAGAGCATGTACCGATAG			
Style 20-2	TGATCTGAGAACATAAAGGGTC			
For1	CGGACGGTGATTTTCACGTA	<i>srtA</i>	55°C	This work
Rev1	CCCAGATGGGTTCTCAAAAA			
For2	TATCAGAAGCCCCAGCGATA			
Rev2	TCAAGGGGTTAAGGTCATGC			

## **Chapitre 3**

Les résultats présentés dans les chapitres précédents ont permis de mettre en évidence une situation originale, à savoir, la présence chez certaines souches de *St. thermophilus* d'un gène *prtS* apparemment fonctionnel mais peu ou pas exprimé. Ces souches présentent par ailleurs, des capacités acidifiantes en lait plus faibles que les souches qui expriment fortement *PrtS*. Cette différence n'est pas attribuable à un dysfonctionnement de l'activité de l'uréase. Ces résultats posent les questions suivantes :

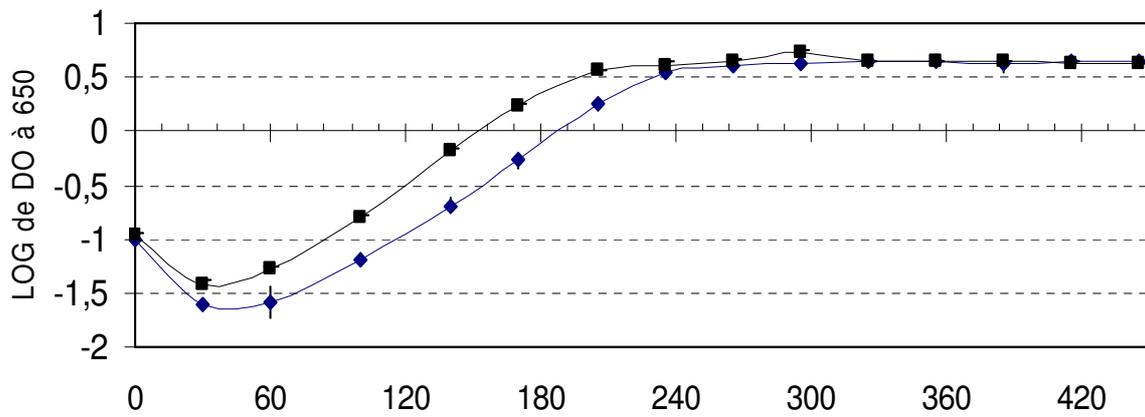
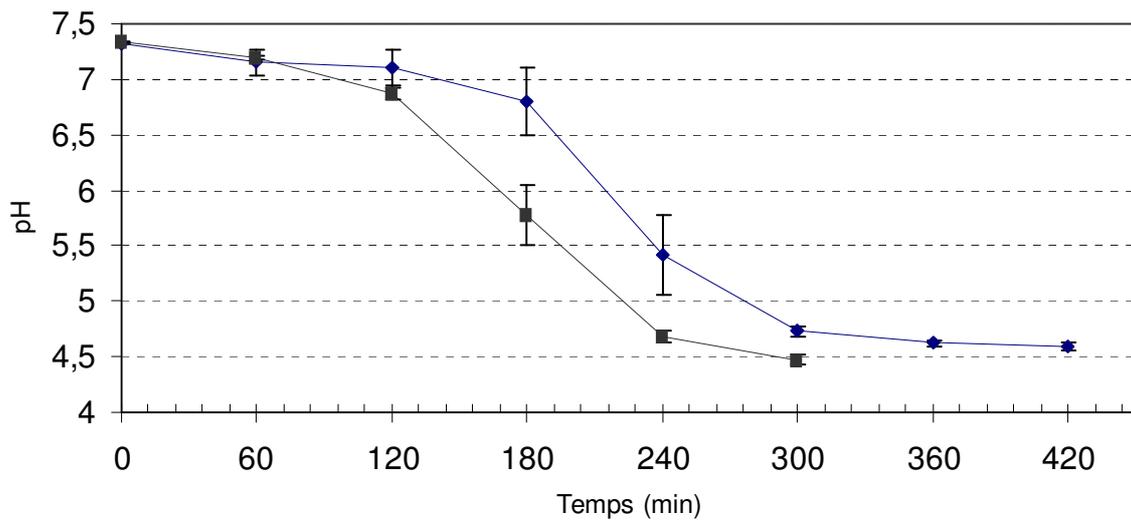
1. A quel taux le gène *prtS* est-il transcrit chez les souches qui le possèdent mais qui expriment peu ou pas la protéase ?
2. D'autres gènes du métabolisme azoté, appartenant ou non au même régulon, sont-ils exprimés différemment également ?

Pour répondre à ces questions, nous avons entrepris d'étudier l'expression du gène *prtS* et de gènes intervenant directement ou indirectement dans le métabolisme azoté, pour la plupart. Certains de ces gènes pourraient appartenir au régulon *CodY*. L'expression de ces gènes a été entreprise chez deux souches, la souche PB302 et la souche PB180, qui possèdent toutes deux le même allèle *prtS*.

## **1. Etude de la croissance de *St. thermophilus* PB302 et PB180 en lait et en milieu M17**

La croissance des souches PB302 et PB180 (Figure 12 et 13) a été suivie en milieu M17 et lait à 42°C, par mesure de pH et détermination de la densité cellulaire. Si les deux milieux contiennent du lactose comme source de carbone, la source azotée n'est pas accessible aussi facilement en milieu lait. En effet, le lait est pauvre en peptides et acides aminés libres et riche en protéines, alors que le milieu M17 est riche en peptides et acides aminés (hydrolysats de caséine, de viande, de soja, extrait de levure) (Tableau 8) (Terzaghi et Sandine, 1975).

En milieu M17, les deux souches possèdent une croissance similaire (Figure 12). Le temps nécessaire pour passer d'un pH extracellulaire de 6 à un pH extracellulaire de 5 est sensiblement le même pour les deux souches (proche de 50 minutes) et la D.O. maximale atteinte en fin de phase exponentielle est de 3,6 pour la souche PB302 et de 3,4 pour la souche PB180. Cependant, le temps de génération apparaît légèrement inférieur chez la souche PB302 (20 min contre 23 min pour la souche PB180).

**A****B**

**Figure 12 : Suivi de croissance de *St. thermophilus* PB180 et PB302 en milieu M17 par détermination de la densité cellulaire (mesure de DO à 650 nm) « A » et mesure du pH extracellulaire « B » (PB302 —■—; PB180 —◆—)**

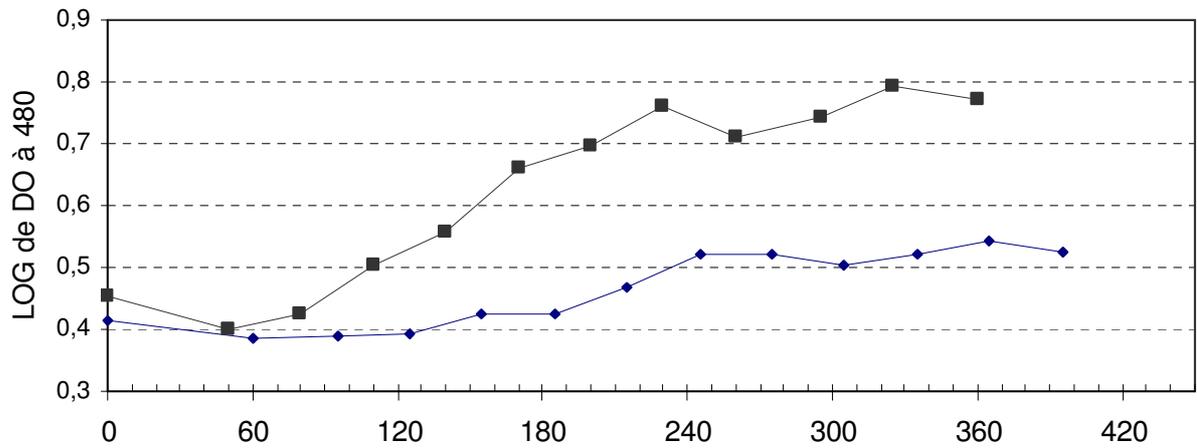
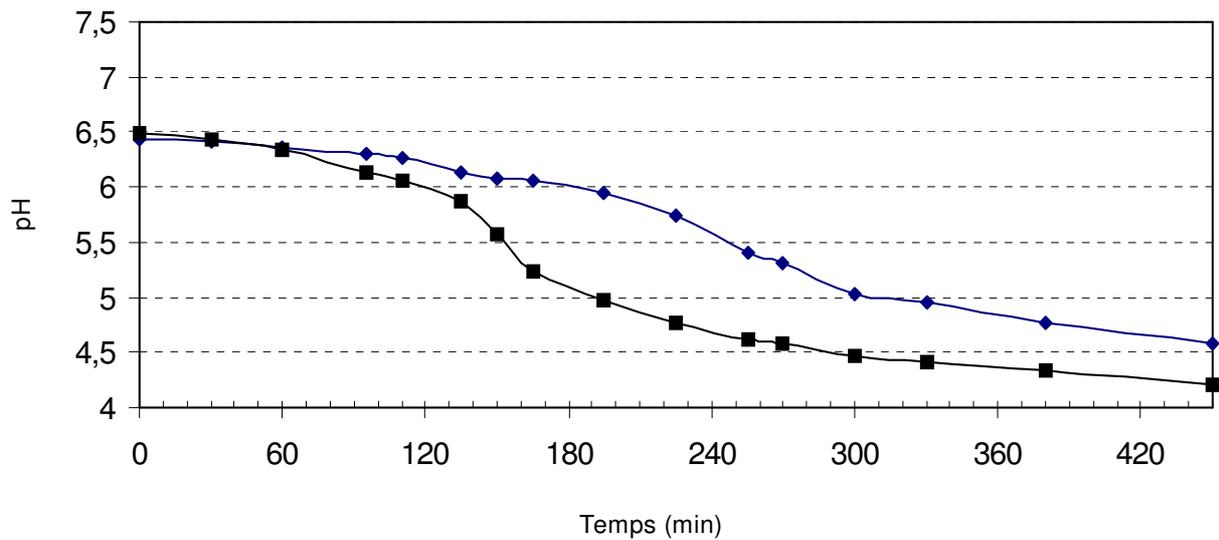
**A****B**

Figure 13 : Suivi de croissance en lait de *St. thermophilus* PB180 et PB302 par détermination de la densité cellulaire (mesure de DO à 480 nm) « A » et mesure du pH « B » (PB302 —■—; PB180 —◆—)

En lait, les différences de croissance entre les deux souches sont nettement plus marquées (Figure 13). La D.O. maximale atteinte à la fin de la phase exponentielle par la souche PB18O est de 3,3 contre 5,8 pour la souche PB302. Enfin, le temps nécessaire pour passer d'un pH extracellulaire de 6 à un pH extracellulaire de 5 est de 86 min pour la souche PB302 contre 122 min pour la souche PB18O.

## **2. Expression de la protéase PrtS au cours de la croissance des souches PB18O et PB302**

### **2.1. Expression de la protéase PrtS au cours de la croissance des souches PB18O et PB302 en milieu M17**

#### **2.1.1. Suivi de l'activité protéolytique de surface au cours de la croissance des souches PB18O et PB302 en milieu M17**

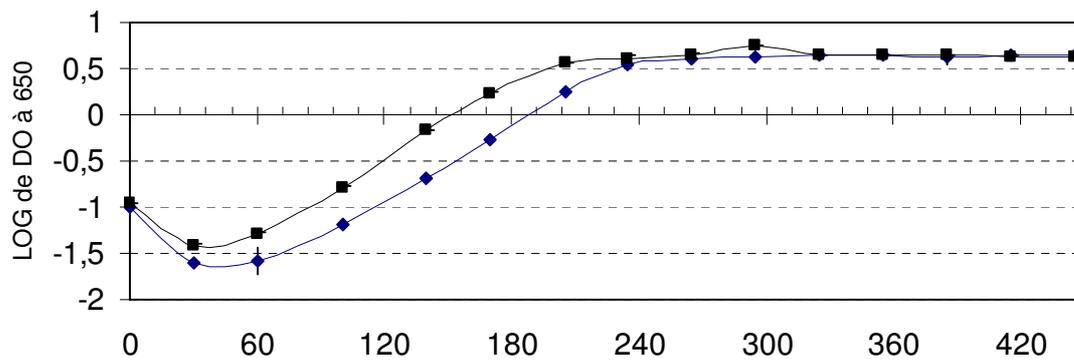
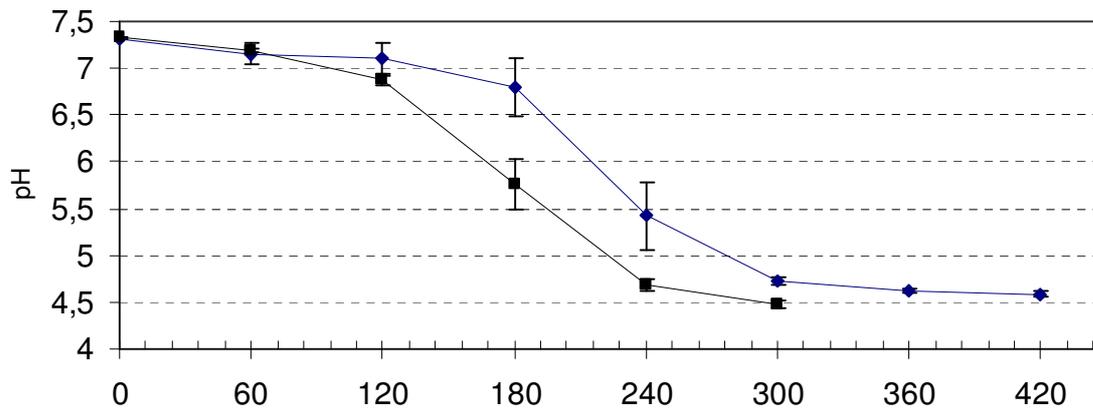
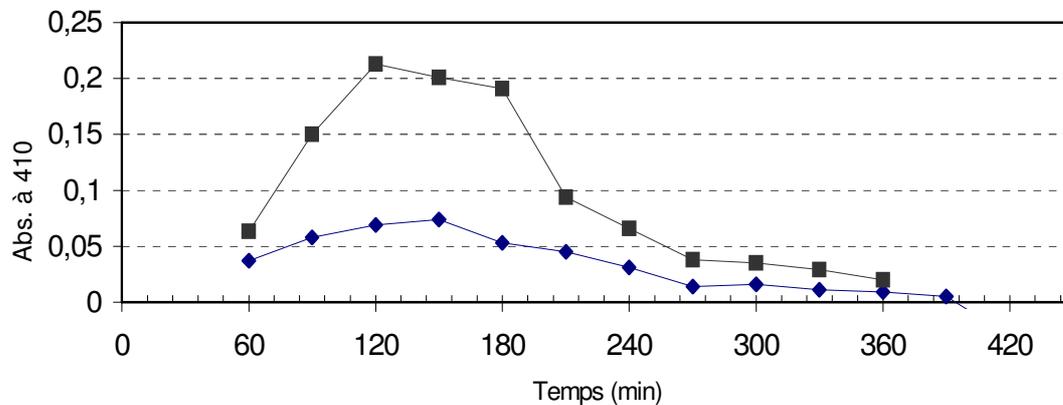
L'activité protéolytique de surface a été quantifiée sur les cellules bactériennes viables. Il est à noter que si cette activité résulte de celle de PrtS, seule protéase de paroi à avoir été identifiée jusqu'à présent chez *St. thermophilus*, nous ne pouvons formellement exclure qu'il puisse y avoir une autre activité protéasique. Au cours de la croissance des deux souches, des prélèvements ont été réalisés toutes les 30 minutes, les cellules, récupérées par centrifugation, ont été remises en suspension, après lavage, dans un tampon Tris-HCl (100 mM, pH7) à une concentration cellulaire finale constante ( $DO_{650\text{ nm}} = 1$ ) en présence d'un substrat synthétique (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pna) pendant 1h30 à 37°C. Après incubation, les cellules ont été éliminées par centrifugation, et l'absorbance du surnageant déterminée à 410 nm. Il est à préciser qu'avant de réaliser cette étude, nous avons réalisé un témoin afin de nous assurer que la/les protéase(s) de paroi responsable(s) de l'activité observée reste(nt) bien ancrée(s) à la paroi et que les bactéries mises en suspension dans le tampon en présence de substrat ne présentent aucune lyse. Pour cela, les bactéries ont été placées dans le même tampon que précédemment mais dépourvu du substrat synthétique. Après 1h30, les cellules bactériennes ont été éliminées par centrifugation et le substrat synthétique ajouté au surnageant. Après 1h30 d'incubation à 37°C, aucune absorbance à 410 nm n'a été détectée, montrant que la protéase PrtS, et éventuellement la ou les autre(s), reste(nt) bien ancrée(s) à la paroi dans les conditions utilisées. De plus, dans le surnageant, une activité peptidasique

pouvant provenir de peptidases intracellulaires qui auraient été libérées lors de la lyse bactérienne, a été recherchée à l'aide d'un autre substrat synthétique (Lys-*p*Na) et non détectée.

Après 1h de croissance, une légère activité a été observée dans les deux souches. Elle est de 0.07 UA chez la souche PB302 contre 0.04 UA chez la souche PB180 (Figure 14). Dans le cas de la souche PB180, l'activité augmente légèrement entre 1 et 2,5 h de croissance pour atteindre son maximum à 0.08 UA, puis diminue pour atteindre après 6h30 de croissance une valeur très faible inférieure à 0.01 UA et être nulle après 7h de croissance. Dans le cas de la souche PB302, l'activité atteint son maximum (0.21 UA) après 2h de croissance et reste relativement stable durant la phase exponentielle pour chuter fortement en début de phase stationnaire, pour atteindre après 6h de croissance, une valeur très faible de 0.02 UA (Figure 14). Ainsi, la souche PB180 possède une activité protéolytique de surface faible durant la phase exponentielle de croissance ce qui contredit les résultats obtenus par zymographie. Cela pourrait provenir d'altérations de la protéine survenues lors de sa récupération. En effet, pour la détection de son activité par analyse zymographique, la protéase a été récupérée après sonication des cellules bactériennes dans un tampon phosphate (50 mM, pH7) contenant 10% de SDS. Il n'est pas exclu que dans ces conditions, certaines molécules aient été altérées. L'activité protéasique étant plus faible chez la souche PB180, l'altération a pu alors être suffisante pour que l'activité PrtS ne soit pas détectée, car en dessous du seuil de détection. Néanmoins, l'activité de PrtS chez la souche PB180 est très nettement inférieure à celle de la souche PB302 quel que soit le temps de croissance.

### **2.1.2. Quantification de l'expression de PrtS à différents stades de croissance des souches PB180 et PB302 en milieu M17**

L'expression du gène *prtS* a été étudiée au cours de la croissance des souches PB180 et PB302 en milieu M17 par RT-PCR quantitative. Pour cette analyse, les ARN totaux ont été extraits à différents stades de croissance : au début de la phase exponentielle (DO<sub>650 nm</sub> de 0,7 et pH de 6,5 et de 6,8 pour les souches PB302 et PB180) ; au milieu de la phase exponentielle (DO<sub>650 nm</sub> de 2 et pH de 6 et de 6,2 pour les souches PB302 et PB180) ; à la fin de la phase exponentielle/début de phase stationnaire (DO<sub>650 nm</sub> de 4 et pH de 4,7 et 5,1 pour les souches PB302 et PB180) et en phase stationnaire (2h après le début de la phase stationnaire, pH de 4,5 et de 4,6 pour les souches PB302 et PB180). A ces quatre points de prélèvement, l'activité protéolytique de surface des deux souches a été déterminée (Tableau 14).

**A****B****C**

**Figure 14 : Suivi de croissance par détermination de la densité cellulaire (mesure de DO à 650 nm) « A », par mesure du pH « B » et suivi de l'activité protéolytique de surface (C) chez *St. thermophilus* PB302 (■) et PB180 (◆) cultivées en milieu M17**

La quantification de l'activité protéolytique a été réalisée en triplicat par mesure de l'absorbance à 410 nm après incubation des cellules en présence de 2 mM du substrat Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pna.

**Tableau 14 : Activité protéolytique de surface des souches *St. thermophilus* PB302 et PB180 à différents temps de croissance en milieu M17**

Souche	Activité protéolytique de surface retrouvée en milieu M17 (Abs. à 410 nm)			
	Début de phase exponentielle (DO <sub>650 nm</sub> = 0,7)	Milieu de phase exponentielle (DO <sub>650 nm</sub> = 2)	Fin de phase exponentielle (DO <sub>650 nm</sub> = 4)	Phase stationnaire (DO <sub>650 nm</sub> = 4,2)
PB180	0,03 ± 0,001	0,04 ± 0,001	0,01 ± 0,002	0,001 ± 0,0001
PB302	0,21 ± 0,01	0,21 ± 0,004	0,08 ± 0,002	0,03 ± 0,001

Comme précédemment, l'activité protéolytique observée dans le cas de la souche PB302 est supérieure à celle de la souche PB180 aux différents temps de croissance testés. Après rétro-transcription des ARN extraits, un ADNc spécifique du gène *prtS* a été recherché par PCRq en utilisant des amorces spécifiques (Prtsquantforprim et Prtsquantrevprim) (Tableau 13 matériels et méthodes). Seuls 3 des 4 temps de croissance ont pu être analysés par RT-PCR quantitative, en raison de la mauvaise qualité des ARNm extraits en phase stationnaire.

Dans le but de valider le Ct (Threshold Cycle) de chaque échantillon, la réaction a été réalisée en triplicat et l'ensemble du travail de PCRq a été réalisé en double. Une moyenne et un écart type ont été déterminés. Seul un ratio d'expression supérieur à 2,0 ou inférieur à 0,5 et observé dans les deux expériences indépendantes sera considéré dans la suite de nos analyses. Pour normaliser la quantité d'ADNc présents dans chaque échantillon, le niveau de transcription du gène *prtS* a été comparé à celui du gène codant le facteur sigma ( $\sigma_{70}/\sigma_{32}$ ), utilisé comme référence. Ce gène est supposé être exprimé à toutes les phases de croissance puisqu'il contrôle les fonctions de ménage chez les bactéries. Il a cependant été retenu après avoir comparé son expression à celle de deux autres gènes souvent utilisés comme gènes de référence : les gènes *gyrA* et *murE* (Tableau 15). Ces deux gènes codent respectivement la sous-unité A de la gyrase et une protéine appartenant à la famille Mur (protéine qui possède un domaine spécifique de ligase). Il a ainsi été observé que le niveau d'expression du gène  $\sigma_{70}/\sigma_{32}$  est similaire quel que soit le temps de culture pour les deux souches. Si de petites variations d'expression entre deux points sont observées, elles peuvent être attribuées à des

variations de la quantité initiale d'ADNc placée dans chaque réaction. D'ailleurs des variations se retrouvent aussi avec les deux autres gènes de référence testés (Tableau 15). Elles ont donc été tolérées.

**Tableau 15 : Récapitulatif des valeurs de Ct des gènes  $\sigma$  70/32, *gyrA* et *murE* obtenues par PCRq à partir des ADNc des souches PB302 et PB180 cultivées en milieu M17**

Souche	Phase de la croissance	$\sigma$ 70/32	<i>gyrA</i>	<i>murE</i>
PB180	Début de phase exponentielle (DO <sub>650 nm</sub> = 0,7)	16,8	17,5	18,5
	Milieu de phase exponentielle (DO <sub>650 nm</sub> = 2)	16,4	16,8	17,7
	Début de phase stationnaire (DO <sub>650 nm</sub> = 4)	17,7	18,3	18,8
PB302	Début de phase exponentielle (DO <sub>650 nm</sub> = 0,7)	15,7	15,7	16,9
	Milieu de phase exponentielle (DO <sub>650 nm</sub> = 2)	15,3	15,5	16,2
	Début de phase stationnaire (DO <sub>650 nm</sub> = 4)	17,4	17,9	17,9

Si le niveau d'expression de *priS* au cours de la croissance de la souche PB180 apparaît constant (Tableau 16), il semble augmenter d'un facteur 2 en fin de phase exponentielle dans le cas de la souche PB302 (Tableau 16). Cette augmentation apparaît contradictoire avec le niveau d'activité protéolytique observé. En effet, en début de phase stationnaire, cette activité diminue significativement chez cette souche (Tableau 14). Deux hypothèses, qui ne s'excluent pas forcément l'une de l'autre, peuvent rendre compte de ce résultat. La première implique que malgré l'augmentation du niveau de transcription de *priS*, le niveau de traduction n'augmente pas, suite à un contrôle de celui-ci. La deuxième implique que la chute du pH extracellulaire qui a lieu en phase stationnaire de croissance inactive l'enzyme comme cela a été observé chez la souche 4F44 (voir chapitre 2).

**Tableau 16 : Evolution des taux<sup>a</sup> d'expression du gène *prtS* au cours de la croissance des souches PB302 et PB180 en milieu M17**

Souche	Phase de la croissance	<i>prtS</i>
PB180	Milieu/début de phase exponentielle	1,40 ± 0,07 (1,44 ; 1,35)
	Début de phase stationnaire/milieu de phase exponentielle	0,41 ± 0,42 (0,11 ; 0,71)
PB302	Milieu/début de phase exponentielle	0,91 ± 0,44 (0,60 ; 1,22)
	Début de phase stationnaire/milieu de phase exponentielle	<b>2,15 ± 0,14</b> <b>(2,06 ; 2,25)</b>

<sup>a</sup> La moyenne et l'écart type déduits des taux obtenus pour les deux expériences indépendantes sont présentés ainsi que les valeurs des taux obtenus pour chacune des expériences (voir entre parenthèses). Les taux indiqués en caractères gras et rouges correspondent à ceux qui ont été considérés comme significatifs et donc pris en compte dans l'analyse.

Bien que pour un des 3 temps de croissance testés, les résultats obtenus ne soient pas significatifs, il semble néanmoins que le gène *prtS* soit davantage exprimé chez la souche PB302 puisque supérieur d'un facteur 4 et 7 à celui de la souche PB180 en début et fin de phase exponentielle (Tableau 17). Ce résultat est cohérent avec le niveau d'activité de l'enzyme observée chez cette souche (Tableau 14).

**Tableau 17 : Comparaison des niveaux<sup>a</sup> d'expression du gène *prtS* entre les souches PB302 et PB180 en milieu M17**

Phase de croissance	Expression de <i>prtS</i> (PB302/PB180)
Début de phase exponentielle (DO <sub>650 nm</sub> = 0,7)	<b>4,03 ± 0,73</b> <b>(4,55 ; 3,51)</b>
Milieu de phase exponentielle (DO <sub>650 nm</sub> = 2)	2,53 ± 0,92 (1,88 ; 3,18)
Début de phase stationnaire (DO <sub>650 nm</sub> = 4)	<b>7,47 ± 3,76</b> <b>(4,82 ; 10,13)</b>

<sup>a</sup> La moyenne et l'écart type déduits des taux obtenus pour les deux expériences indépendantes sont présentés ainsi que les valeurs des taux obtenus pour chacune des expériences (voir entre parenthèses). Les taux indiqués en caractères gras et rouges correspondent à ceux qui ont été considérés comme significatifs et donc pris en compte dans l'analyse.

## 2.2. Quantification de l'expression de la protéase PrtS au cours de la croissance des souches PB18O et PB302 en milieu lait

Afin de déterminer si la différence d'expression de PrtS observée entre les souches PB18O et PB302 en milieu M17 était également observable au cours de leur croissance en milieu lait, l'activité protéolytique de surface et l'expression du gène *prtS* ont été déterminées en début (pH extracellulaire de 6) et milieu de phase exponentielle (pH extracellulaire de 5,3). Cette étude n'a pas pu être réalisée en phase stationnaire, en raison de la coagulation du lait qui a lieu suite à la chute de pH du milieu extracellulaire et qui gêne à la récupération des cellules et à l'obtention d'ARNm de qualité suffisante. Comme cela est présenté dans le tableau 18, l'activité protéolytique observée chez les 2 souches cultivées en lait apparait plus importante qu'après croissance en milieu M17, et ce, pour une même biomasse. Comme précédemment, l'activité protéolytique détectée chez la souche PB302 reste significativement supérieure à celle de la souche PB18O.

**Tableau 18 : Activité protéolytique de surface retrouvée chez les souches *St. thermophilus* PB302 et PB18O cultivées en lait**

Souche	Activité protéolytique de surface retrouvée en lait (Abs. à 410 nm)	
	Début de phase exponentielle (pH = 6)	Milieu de phase exponentielle (pH = 5,3)
PB18O	0,12 ± 0,04	0,21 ± 0,03
PB302	0,41 ± 0,08	0,52 ± 0,02

Aux deux temps de croissance testés, les ARNm ont été extraits et rétrotranscrits. Comme précédemment, pour valider le Ct de chaque échantillon, chaque réaction a été réalisée en triplicat et l'ensemble du travail de PCRq a été réalisé en double à l'exception du prélèvement réalisé à pH 6 pour la souche PB18O. Une moyenne et un écart type ont été déterminés pour chaque ratio à partir des résultats de ces deux expériences. Comme précédemment, seul un ratio d'expression supérieur à 2,0 ou inférieur à 0,5 et observé dans les deux expériences indépendantes sera considéré dans la suite de nos analyses. Le gène  $\sigma_{70/32}$

a été validé comme gène de référence, après avoir comparé son niveau d'expression à celui des deux autres gènes de référence testés dans le cas précédent : *gyrA* et *murE* (Tableau 19).

**Tableau 19 : Récapitulatif des valeurs de Ct des gènes  $\sigma70/32$ , *gyrA* et *murE* obtenues par PCRq à partir des ADNc issus des souches PB302 et PB180 cultivées en milieu lait**

Souche	Phase de croissance	$\sigma70/32$	<i>gyrA</i>	<i>murE</i>
PB180	Milieu de phase exponentielle (pH = 5,3)	15,8	16,0	17,8
	Début de phase exponentielle (pH = 6)	20,2	21,8	23,4
PB302	Milieu de phase exponentielle (pH = 5,3)	17,8	18,0	18,6
	Début de phase exponentielle (pH = 6)	17,5	17,0	17,8

En milieu lait et pour les 2 temps de croissance testés, l'expression du gène *prtS* apparaît similaire chez les deux souches (Tableau 20). Par contre, comme en milieu M17, l'expression du gène *prtS* est plus importante chez la souche PB302 (7 fois plus de transcrit *prtS* en début de croissance à pH 6 et 5,7 fois plus à pH 5,3, Tableau 21).

**Tableau 20 : Taux d'expression du gène *prtS* au cours de la croissance des souches PB302 et PB180\* en lait**

Souche	Phase de la croissance	Expression de <i>prtS</i>
PB180	milieu/début de phase exponentielle	0,53
PB302	milieu/début de phase exponentielle	0,43 ± 0,26 (0,25 ; 0,61)

\* Pour des raisons techniques le point pH 6 (début de la phase exponentielle) en lait n'a pas été reproduit chez la souche PB180.

La moyenne et l'écart type déduits des taux obtenus pour les deux expériences indépendantes sont présentés ainsi que les valeurs des taux obtenus pour chacune des expériences (voir entre parenthèses).

**Tableau 21 : Comparaison des niveaux d'expression du gène *prtS* entre les deux souches étudiées (souche PB302/souche PB180\*) cultivées en lait**

Phase de croissance	Expression de <i>prtS</i> (PB302/PB180)
Début de phase exponentielle (pH = 6)	<b>7,01</b>
Milieu de phase exponentielle (pH = 5,3)	<b>5,70 ± 3,33</b> <b>(3,35 ; 8,06)</b>

\*Pour des raisons techniques le point pH 6 en lait n'a pas été reproduit chez la souche PB180.

La moyenne et l'écart type déduits des taux obtenus pour les deux expériences indépendantes sont présentés ainsi que les valeurs des taux obtenus pour chacune des expériences (voir entre parenthèses). Les taux indiqués en caractères gras et rouges correspondent à ceux qui ont été considérés comme significatifs et donc pris en compte dans l'analyse.

### **3. Expression de différents gènes du métabolisme azoté chez *St. thermophilus* PB180 et PB302 lors de la croissance en milieu M17 ou lait**

Les principales fonctions identifiées chez les LAB comme nécessaires à une croissance optimale dans le lait concernent la nutrition azotée. Bien que les données concernant *St. thermophilus* soient plus rares, il est probable que la situation soit similaire. En effet, comme toutes les LAB, *St. thermophilus* est auxotrophe pour plusieurs acides aminés et doit donc les trouver dans le milieu extérieur sous la forme d'acides aminés ou de peptides que la bactérie internalisera. Le lait étant un milieu pauvre en acides aminés libres et en peptides, la bactérie doit donc les générer à partir des protéines du lait. Ayant montré précédemment, que les souches PB180 et PB302 n'ont pas la même croissance dans le lait et expriment différemment la protéase PrtS, nous avons étudié l'expression d'autres gènes du métabolisme azoté, essentiellement, afin de déterminer si la situation rencontrée avec le gène *prtS* pouvait s'appliquer à d'autres gènes. Ainsi, l'expression de 13 autres gènes a été étudiée au cours de la croissance des deux souches en milieu M17 et lait. Il s'agit de régulateurs du métabolisme azoté, de transporteurs de peptides, de gènes codant des peptidases, des gènes impliqués dans la synthèse d'acides aminés branchés ou dans le métabolisme des glucides (Tableau 22).

Les deux régulateurs étudiés sont le produit du gène *codY* et du gène *relA*. Celui-ci code l'enzyme qui permet la synthèse de (p)ppGpp à partir du GTP. Il s'agit d'une alarmone nécessaire à la mise en place de la réponse stringente, suite à des carences nutritionnelles ou lors d'un stress acide comme chez *Lc. lactis* (Rallu *et al.*, 2000, 1996), situation rencontrée lors de l'entrée en phase stationnaire chez *St. thermophilus*. Le régulateur CodY a été sélectionné, quant à lui, pour deux raisons. Tout d'abord, un motif de fixation de CodY a été détecté en amont du gène *priS* (voir chapitre 1), et également d'autres gènes sélectionnés pour cette étude (Tableau 22). Ensuite, CodY est un régulateur transcriptionnel qui est présent dans plusieurs espèces de bactéries à Gram<sup>+</sup> aux génomes à bas pourcentage en bases G et C et qui chez *Lc. lactis* réprime la transcription d'une dizaine de gènes en réponse à la richesse du milieu en acides aminés ramifiés et/ou GTP (Guédon *et al.*, 2001a, 2001b; den Hengst *et al.*, 2005a, 2005b; Serror et Sonenshein, 1996). En outre, des expériences de retardement sur gel ont récemment montré que la protéine CodY de *St. thermophilus* est capable de se fixer sur les promoteurs de 14 gènes appartenant au système protéolytique (*priS*, *amiA1*, *pepA*, *pepS*, *pepN*, *pepC*, *pepB*, *pepQ*, *pepV*, *pepT*, *pepM*, *pepX*, *pepP* et *pepO*) ce qui suggère que CodY de *St. thermophilus* pourrait jouer un rôle similaire à son homologue de *Lc. lactis* (Liu *et al.*, 2009).

Concernant les systèmes de transport de peptides, l'expression du système Ami et du gène *dtpt* ont été étudiées. Le choix du premier est incontournable car le système Ami est le seul système de transport d'oligopeptides caractérisé chez cette espèce (Garault *et al.*, 2002). Aucun système de transport de di-tripeptides n'a été caractérisé chez *St. thermophilus*, mais l'analyse d'un triple mutant *amiA1/A2/A3* a révélé la présence d'au moins un système impliqué dans le transport de dipeptides (Garault *et al.*, 2002). Un système de transport proton-dépendant, homologue à DtpT de *Lc. lactis* (Bolotin *et al.*, 2004; Hols *et al.*, 2005), étant présent sur les génomes des souches CNRZ1066, LMG18311 et LMD-9, il a été retenu pour notre étude.

**Tableau 22 : Gènes dont l'expression a été étudiée au cours de la croissance des souches PB180 et PB302**

Opéron <sup>a</sup>	Gène (STER_#) <sup>b</sup>	Pourcentage d'identité entre PB302 et LMD9 <sup>c</sup>		Boîte CodY <sup>d</sup>	Distance/ATG <sup>e</sup>
		Gène	Protéine		
	<i>ackA</i> (1834)	99	99	<b>GGAAATCAGATAATT</b>	-66
	<i>amiA1</i> (1409)	99	98	<b>ATTATTCTGAAAAAT</b>	-106
<i>amiA1CDEF</i>	<i>amiC</i> (1408)	99	100		
	<i>amiD</i> (1407)	100	100		
	<i>amiE</i> (1406)	100	100		
	<i>amiF</i> (1405)	100	100		
	<i>amiA3</i> (1411)	100	100	<b>AATTTTCTGATAAAA</b>	-63
	<i>bcaT</i> (0635)	99	99	<b>AATTGTCAGAAATTT</b>	-75
	<i>codY</i> (1599)	100	100	<b>AATTTTCAGACAATT</b>	-117
	<i>dtpT</i> (0984)	99	99		
	<i>ilvC</i> (1848)	100	100	<b>AATCGTCAGATTGAT</b>	-342
<i>ilvDBN</i>	<i>ilvD</i> (1851)	99	98	<b>GAATTACAGAAATAT</b>	-88
	<i>ilvB</i> (1850)	100	100		
	<i>ilvN</i> (1849)	100	100		
	<i>Ldh</i> (1257)	100	100		
	<i>livJ</i> (0398)	100	100	<b>AATTTTCTGATAATT</b>	-50
<i>livJHMGF</i>	<i>livH</i> (0399)	99	99		
	<i>livM</i> (0400)	100	100		
	<i>livG</i> (0401)	100	100		
	<i>livF</i> (0402)	100	100		
	<i>pepC</i> (0276)	100	100	<b>AATTTTCAGAAATTA</b>	-42
	<i>pepN</i> (1012)	100	100	<b>AAATATCAGTCTGTT</b>	-34
	<i>pepX</i> (1633)	99	100	<b>ATATTTCTGGAATAT</b>	-28
	<i>relA</i> (0200)	99	99		

La séquence et la localisation d'un éventuel motif de fixation de la protéine CodY sont indiquées.

<sup>a</sup> : Dans le cas des opérons, seule l'expression du gène souligné a été quantifiée par PCR en temps réel.

<sup>b</sup> : Position du gène concerné sur le génome de *St. thermophilus* LMD-9.

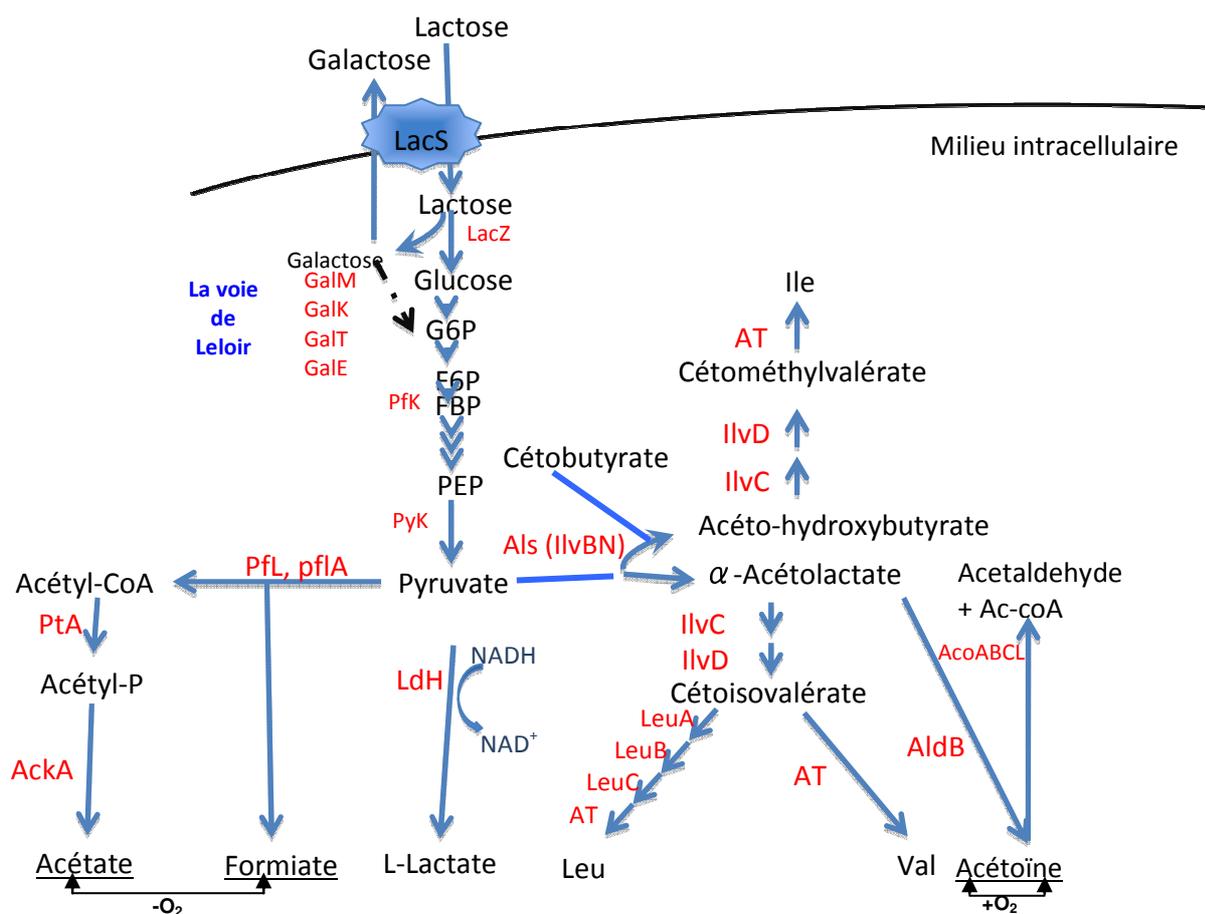
<sup>c</sup> : Pourcentages d'identité calculés au niveau nucléotidique et protéique (dédit à partir de la séquence nucléotidique) à l'aide du programme « ClustalW ».

<sup>d</sup> : les résidus qui diffèrent de la séquence consensus (AATTTTCWGAAAATT), mise en évidence par Den Hengst *et al.*, (2005) chez *Lc. lactis* sont en gras (W = A ou T).

<sup>e</sup> : position relative en paires de bases par rapport à l'ATG du gène correspondant (ou du premier gène de l'opéron), - en amont, + en aval.

Concernant les peptidases intracellulaires, nous avons choisi d'étudier l'expression de trois gènes (*pepC*, *pepN* et *pepX*), codant pour trois peptidases dont deux aminopeptidases générales PepN et PepC déjà caractérisées chez *St. thermophilus* (Chapot-Chartier *et al.*, 1994; Chavagnat *et al.*, 1999). La peptidase PepX (une X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase) a été étudiée en raison de sa capacité à hydrolyser les séquences riches en résidus prolyl (Anastasiou *et al.*, 2002; Tsakalidou *et al.*, 1997), la fraction caséinique qui représente 80% des protéines du lait contenant de nombreux résidus prolyl.

Il a été montré que la voie de biosynthèse des acides aminés branchés (BCAA pour Branched-Chain Amino Acid) est essentielle pour la croissance de *St. thermophilus* dans le lait (Garault *et al.*, 2000), la quantité de BCAA présente dans le lait ne suffisant pas à une croissance optimale. *St. thermophilus* possède l'ensemble des gènes intervenant dans la synthèse des BCAA dont le gène *bcaT* qui a fait l'objet d'analyse dans notre étude. Ce gène code une amino-transférase intervenant dans la biosynthèse des BCAA à partir des deux précurseurs, le cétoisovalérate et le cétométhylvalérate (Figure 15). Concernant les voies de la production du cétoisovalérate et du cétométhylvalérate, nous avons étudié l'expression des gènes *ilvB* et *ilvC* codant respectivement l'alpha-acétolactate synthétase (IlvB) et la céto-acide réducto-isomérase (IlvC) (Figure 15). Ces deux gènes ont été choisis car une absence totale de croissance des mutants *ilvB* et *ilvC* de *St. thermophilus* a été détectée en milieu chimiquement défini (MCD) sans Ile, Leu et Val. A l'inverse, en présence des 3 BCAA, le taux de croissance obtenu est similaire à celui de la souche sauvage (Garault *et al.*, 2000). Ces résultats montrent donc que *St. thermophilus* est capable de synthétiser mais aussi de capter ces acides aminés dans l'environnement. Il s'agit d'un transport actif dont l'énergie est fournie par l'ATP. Des études *in silico* ont révélé la présence d'un système de transport fonctionnel (*livJHMGF*) homologue au système *liv* de *St. pneumoniae* qui est impliqué dans le transport des acides aminés branchés (Hols *et al.*, 2005). Aussi, nous avons choisi d'étudier l'expression de l'opéron *livJHMGF* chez *St. thermophilus*.



**Figure 15 : Catabolisme du pyruvate par *St. thermophilus* selon Hols *et al.*, (2005) et Garault *et al.*, (2000)**

Enzymes catalysant potentiellement les différentes voies métaboliques : LdH : lactate déshydrogénase ; PtA : phosphate acétyltransférase ; AckA : acétate kinase ; PflL : pyruvate-formate lyase ; AldB :  $\alpha$ -acétolactate décarboxylase ; IlvBN : acétolactate synthétase ; IlvC : céto-acide réducto-isomérase ; IlvD : acide dihydroxydeshydratase ; AT : Aminotransférase des acides aminés à chaîne ramifiée ; LeuA : isopropyl malate synthase ; LeuB : isopropyl malate deshydrogénase ; LeuC : isopropyl malate deshydratase ; AcoABCL : complexe acétoïne deshydrogénase. Glycolyse : FBP : fructose diphosphate ; PFK : 6-phosphofructokinase ; PyK : pyruvate kinase. Voie de Leloir : GalM : aldose 1-épimérase ; GalK : galactokinase ; GalT : galactose 1-phosphate Uridylyltransférase ; GalE1 : UDP-glucose 4-épimérase. Les produits finaux de la fermentation du pyruvate détectés dans des conditions aérobies (+O<sub>2</sub>) ou anaérobie (-O<sub>2</sub>) sont soulignés.

*St. thermophilus* est une bactérie homofermentaire qui produit majoritairement du L-lactate (plus de 95% des produits finaux). Elle est également capable de produire de petites quantités de produits alternatifs tels que l' $\alpha$ -acétolactate ( $\alpha$ -AL), l'acétoïne, l'acétaldéhyde, le

formiate et l'acétate (Ott *et al.*, 2000; Perez *et al.*, 1991; Tinson *et al.*, 1982). Trois enzymes impliquées dans l'utilisation du pyruvate sont détectées chez *St. thermophilus* : la L-lactate déshydrogénase (LdH), la pyruvate-formiate lyase (Pfl et son enzyme activatrice PflA) et l'alpha-acéto lactate synthétase (AIS) (Hols *et al.*, 2005). La L-lactate déshydrogénase catalyse la conversion du pyruvate en L-lactate et permet l'oxydation du NADH produit pendant la glycolyse, en NAD<sup>+</sup> (Figure 15). Son inactivation est probablement létale pour la cellule et ce probablement en raison de l'absence d'une voie alternative pour la régénération du NAD<sup>+</sup> (Hols *et al.*, 2005). Pour évaluer un potentiel effet de la L-lactate déshydrogénase sur la croissance de *St. thermophilus*, nous avons étudié l'expression du gène *ldh* chez les deux souches PB302 et PB180 en lait et en milieu M17.

Dans des conditions aérobies (+O<sub>2</sub>), l'acéto lactate synthétase (IlvBN) et l'alpha-acéto lactate décarboxylase (AldB) permettent d'obtenir de l'acétoïne à partir du pyruvate (Figure 15). Nos échantillons ayant été prélevés à partir de cultures réalisées dans des conditions anaérobies, seuls des gènes codant des enzymes intervenant dans les voies métaboliques du pyruvate en conditions anaérobies ont été retenus.

En dehors de la L-lactate déshydrogénase, le gène codant l'acétate kinase (*ackA*) a été sélectionné. Ce gène intervient dans la voie de production de l'acétate (Figure 15). La voie qui permet la production de formiate et d'acétate à partir du pyruvate en conditions anaérobies est constituée des enzymes suivantes : la pyruvate formiate lyase (PFL), la phosphotransacétylase (PtA) et l'acétate kinase (AckA) (Figure 15). La pyruvate formiate lyase (PFL) qui catalyse le clivage non oxydatif du pyruvate en formiate et en acétyl-CoA (Knappe et Sawers, 1990), est fortement induite lors de la croissance en lait de *St. thermophilus* (Derzelle *et al.*, 2005).

Le formiate produit est probablement impliqué dans la biosynthèse des purines. Nous avons choisi de suivre l'expression du gène *ackA* et non de celui codant la phosphotransacétylase qui nous semblait intermédiaire dans la production de l'acétate (Figure 15). L'acétate kinase joue un double rôle dans la cellule. A partir de l'acétyl-CoA, l'activité phosphotransacétylase couplée avec celle de l'acétate kinase produisent de l'acétate qui sera excrétée. C'est un moyen pour la cellule d'éviter l'accumulation des produits finaux du métabolisme du lactose (par exemple pyruvate et acétyl-CoA). Cette activité peut aussi être une source importante d'ATP au cours de la fermentation (Dauner *et al.*, 2001).

### 3.1. Séquençage des gènes sélectionnés chez les deux souches PB180 et PB302

Afin de s'assurer qu'aucun des gènes sélectionnés pour cette étude ne présentait de mutation pouvant expliquer sa non expression dans une ou l'autre des deux souches testées, les gènes *codY*, *pepX*, *pepC*, *pepN*, *amiA1CDEF*, *amiA3*, *ctpT*, *livJHMGF*, *ilvC*, *ilvDBN*, *bcaT*, *ackA*, *ldh* et *relA* ont été amplifiés par PCR chez les souches PB180 et PB302 puis séquencés. Les deux souches PB180 et PB302 ne possèdent pas le gène *amiA2*. L'analyse des séquences obtenues a révélé que pour chacun des gènes testés, les deux souches portent le même allèle, en incluant les régions promotrices et terminatrices (350 et 150 pb en amont et en aval de chaque gène étudié). La présence, dans certains cas, d'une boîte CodY plus ou moins conservée en amont des gènes étudiés a été détectée (Tableau 22). Les séquences obtenues présentent des pourcentages d'identité allant de 99% à 100% au niveau nucléotidique et de 98% à 100% au niveau protéique avec leurs homologues présents chez *St. thermophilus* LMD-9 (Tableau 22). Le système Ami est identique chez les deux souches étudiées (Tableau 22). Il se compose des protéines transmembranaires AmiC et D, des protéines cytoplasmiques AmiE et F (liant l'ATP) et des protéines liant les oligopeptides AmiA1 et AmiA3. L'ordre de ces gènes est classique. Le gène codant la protéine affine aux oligopeptides (*amiA1*) est situé en amont des quatre autres gènes de l'opéron *amiA1CDEF*. Le gène qui code la deuxième protéine affine aux oligopeptides (*amiA3*) ne fait pas partie de cet opéron et est transcrit indépendamment. Le pourcentage d'identité entre les deux gènes *amiA1* et *amiA3* est relativement élevé (86%) ce qui ne nous a pas permis de quantifier leur expression directement en raison de l'impossibilité de dessiner des amorces spécifiques à chaque gène. Cependant, Garault *et al.*, (2002) ont démontré que les protéines affines (AmiA2 et/ou AmiA3) aux oligopeptides peuvent fonctionner avec le même système perméase que AmiA1. Pour cela nous avons choisi de quantifier l'expression du système Ami *via* la quantification de l'expression du gène *amiF*.

<i>St. thermophilus</i>	MANLLDKTR	KITSILQRS-	VDSLEGDLPY	NNMAAQLADI
<i>St. mutans</i>	MANLLSKTR	RITSILQRS-	VESLQSDLPY	NTIADQLAEI
<i>St. agalactiae</i>	MPNLLEKTR	KITSILQRS-	VDSLDAELPY	NTMAAQLADI
<i>St. pneumoniae</i>	MAHLEKTR	KITSILKRS-	EEQLQDELPLY	NAITRQLADI
<i>St. gordonii</i>	MAHLEKTR	KITSILKRS-	EEQLQEELPY	NDITRQLAEI
<i>St. suis</i>	MTTLLEKTR	NITSILKRS-	EEQLAEELPY	NAIAEHLSAI
<i>Lc. lactis</i>	MATLLEKTR	KITAILQDG-	VTDLQQELPY	NSMTERLANV
<i>E. faecalis</i>	MATLLEKTR	QVNELLQKNN	LFDVQAELPY	NKMAMILGDI
<i>B. subtilis</i>	MALLQK TR	IINSMLQAA-	---AGKPVNF	KEMAETLRDV
<i>S. aureus</i>	MSLLSK TR	ELNTLLQKH-	---KGIADVDF	KDVAQTISV
<i>C. difficile</i>	MASEVLQKTR	KINKTLQTS-	---GGSSVSF	DLLAGALGDV

<i>St. thermophilus</i>	IDCNAIIVNG	GGALLGFAMK	YKTNNDRVE-	KFFKAKQLPE
<i>St. mutans</i>	IDCNACIIDG	SGIILGYAMK	YKTNTDRVE-	EFFQAKKLPD
<i>St. agalactiae</i>	IDCNACIING	GGNLLGYAMK	YKTNTDRVE-	EFFETKQFPD
<i>St. pneumoniae</i>	IHCNACIINS	KGRLGIFYMR	YKTNTDRVE-	QFFQTKIFPD
<i>St. gordonii</i>	MDCNACIVNS	KGRLGIFYMR	YKTNNDRVE-	AFYQTKMFPD
<i>St. suis</i>	IDCNACIINS	EGEVLGYHMS	YETNNDRVE-	EFFQNKQFPE
<i>Lc. lactis</i>	IDCNACVINT	KGELGYSLP	YNTNNDRVD-	QFFYDRKLPD
<i>E. faecalis</i>	LESNAYIISS	SGDLLGYTEK	LDVNNARIK-	NMFKEKKFPQ
<i>B. subtilis</i>	IDSNIFVVS	RGKLLGYSIN	QQIENDRMK-	KMLEDRQFPE
<i>S. aureus</i>	TVTNVFIVSR	RGKILGSSLN	ELLKSQR II-	QMLEERHIPS
<i>C. difficile</i>	LSSNVYVSA	KGKVLGLHLN	DVQDSSVIED	EYTKQKKFSD

<i>St. thermophilus</i>	EYIRGISRVY	DTQENIGIDS	DLTIFPVELK	DDFPDGLTTI
<i>St. mutans</i>	DYVKSASRIY	DTEANLSVEN	DLTIFPIESK	DIYPDGLTTI
<i>St. agalactiae</i>	YYVKSASRVY	DTEANLSVDN	DLSIFPVETK	ENFQDGITTI
<i>St. pneumoniae</i>	DYVQGANMIY	ETEANLPVEH	DMSIFPVESR	DDFPDGLTTI
<i>St. gordonii</i>	DYIRSANLIY	DTEANLPVEH	ELSIFPVETQ	SDFPDGLTTI
<i>St. suis</i>	GYVKAVAQVY	DTQVNLPVES	ELTAIPVESR	STYPNGLTTI
<i>Lc. lactis</i>	EYVRAAVRVY	DTMANVPVDR	PLAIFPEESL	SDFPKGVTTL
<i>E. faecalis</i>	GYTEAVDMLK	VTEANIPIDS	DLTAFPFESR	ELYPFGLTTI
<i>B. subtilis</i>	EYTKNLFNVP	ETSSNLDINS	EYTAFPVENR	DLFQAGLTTI
<i>S. aureus</i>	EYTERLMEVK	QTESNIDIDN	VLTVPFPPENR	ELFIDSRTTI
<i>C. difficile</i>	EYTQNVLKID	ETLENLNGEK	ILEIFPEEHG	RL--QKYTTV

<i>St. thermophilus</i>	APIYGGMRL	GSFIIWRNDH	DFVDDDLILV	EIASTVVGLQ
<i>St. mutans</i>	APIYGGMRL	GSLIIWRNDK	EFNDDDLILI	EISSTVVGIQ
<i>St. agalactiae</i>	APIYGGMRL	GFIIWRNDK	EFSDDDLILV	EIASTVVGIQ
<i>St. pneumoniae</i>	APIHVSGIRL	GSLIIWRNDK	KFEDEDLVLV	EIASTVVGIQ
<i>St. gordonii</i>	APIHVSGIRL	GSLIIWRNDE	KFDNDDLVLV	EISSTVVGIQ
<i>St. suis</i>	APIHVTGIRF	GSLIIWRNDE	QFHDDLILV	EIAATVVGIQ
<i>Lc. lactis</i>	APIYGSGMRL	GTFIMWREDG	EFTDDDLVLV	ELATTVIGVQ
<i>E. faecalis</i>	VPLYGAGKRL	GTIILARVEK	SFNEDDLVLA	EYSATVVMQ
<i>B. subtilis</i>	VPIIGGGERL	GTLILSRLQD	QFNDDDLILA	EYGATVVGME
<i>S. aureus</i>	FPILGGGERL	GTLVLGRVHD	DFNENDLVLG	EYAATVIGME
<i>C. difficile</i>	VPILGSGQRL	GTLVLSRYSN	SFNDDDLVIA	EYSATVVGLE

	161			200
<b><i>St. thermophilus</i></b>	LLHLQTENLE	ETIRKQTAIN	MAINTLSYSE	IKAVSAILNE
<b><i>St. mutans</i></b>	LLNLQTENLE	ETIRKQTAIN	MAINTLSYSE	MKAVAAAILNE
<b><i>St. agalactiae</i></b>	LLNLQTENLE	ENIRKQTAVT	MAINTLSYSE	MKAVAAAILGE
<b><i>St. pneumoniae</i></b>	LLNFQREEDE	KNIRRRRTAVT	MAVNTLSYSE	LRAVSAILGE
<b><i>St. gordonii</i></b>	LLNFQREEDE	KNIRRRRTAVT	MAVNTLSYSE	LRAVSAILGE
<b><i>St. suis</i></b>	LLNFQREEDE	KNIRRRRAAVN	MAVNTLSYSE	MKAVAAAILGE
<b><i>Lc. lactis</i></b>	LSNLKLEQME	ENIRKDTMAT	MAVNTLSYSE	MKAVKAIIEE
<b><i>E. faecalis</i></b>	ILYHQSRTE	AEVRSATAVQ	MAINTLSYSE	LKAVHAIFFEA
<b><i>B. subtilis</i></b>	ILREKAEIE	EEARSKAVVQ	MAISSLSYSE	LEAIEHIFEE
<b><i>S. aureus</i></b>	ILREKHSEVE	KEARDKAAIT	MAINSLSYSE	KEAIEHIFEE
<b><i>C. difficile</i></b>	ILRAIGEELE	EEMRKKAVVQ	MAIGTSLYSE	LEAVEHIFAE
	201			240
<b><i>St. thermophilus</i></b>	LDGLEGR <b>HTH</b> LT <b>HTH</b>	<b>HTH</b> SVIADRIGIT	<b>HTH</b> RSVIVNALRK	LESAGIIESR
<b><i>St. mutans</i></b>	LDGNEGRL <b>HTH</b> LT <b>HTH</b>	<b>HTH</b> SVIADRIGIT	<b>HTH</b> RSVIVNALRK	LESAGIIESR
<b><i>St. agalactiae</i></b>	LDGLEGR <b>HTH</b> LT <b>HTH</b>	<b>HTH</b> SVIADRIGIT	<b>HTH</b> RSVIVNALRK	LESAGIIESR
<b><i>St. pneumoniae</i></b>	LNGNEGQL <b>HTH</b> LT <b>HTH</b>	<b>HTH</b> SVIADRIGIT	<b>HTH</b> RSVIVNALRK	LESAGIIESR
<b><i>St. gordonii</i></b>	LNGNEGHL <b>HTH</b> LT <b>HTH</b>	<b>HTH</b> SVIADRIGIT	<b>HTH</b> RSVIVNALRK	LESAGIIESR
<b><i>St. suis</i></b>	LDGNEGQL <b>HTH</b> LT <b>HTH</b>	<b>HTH</b> SVIADRIGIT	<b>HTH</b> RSVIVNALRK	LESAGIIESR
<b><i>Lc. lactis</i></b>	LDGEEGH <b>HTH</b> VIA	<b>HTH</b> SVIADKIGIT	<b>HTH</b> RSVIVNALRK	LESAGVIESR
<b><i>E. faecalis</i></b>	LDGEEGR <b>HTH</b> LT <b>HTH</b>	<b>HTH</b> SSIADDEIGIT	<b>HTH</b> RSVIVNALRK	LESAGIIESR
<b><i>B. subtilis</i></b>	LDGNEGL <b>HTH</b> LVA	<b>HTH</b> SKIADRVGIT	<b>HTH</b> RSVIVNALRK	LESAGVIESR
<b><i>S. aureus</i></b>	LGGTEGL <b>HTH</b> LIA	<b>HTH</b> SKVADGVGIT	<b>HTH</b> RSVIVNALRK	LESAGVIESR
<b><i>C. difficile</i></b>	LDGKEGL <b>HTH</b> LVA	<b>HTH</b> SKIADRVGIT	<b>HTH</b> RSVIVNALRK	FESAGVIESR
	241		267	
<b><i>St. thermophilus</i></b>	SLGMKGTYLK	VLNEGIYDKL	KEYE	
<b><i>St. mutans</i></b>	SLGMKGTYLK	VINEGIFDKL	KDYS	
<b><i>St. agalactiae</i></b>	SLGMKGTYLK	VINEGIFDKL	KEYN	
<b><i>St. pneumoniae</i></b>	SLGMKGTYLK	VLISDIFEEV	KKRDY	
<b><i>St. gordonii</i></b>	SLGMKGTYLK	VLIPDVFEI	KKRDY	
<b><i>St. suis</i></b>	SLGMKGTYLK	VLIPAIFFDEI	KKRDY	
<b><i>Lc. lactis</i></b>	SLGMKGTYLK	VLNTGLFDKL	AGRNF	
<b><i>E. faecalis</i></b>	SLGMKGTYLK	VLNQQFIKEL	EK	
<b><i>B. subtilis</i></b>	SLGMKGTYIK	VLNNKFLIEL	ENLKSH	
<b><i>S. aureus</i></b>	SLGMKGTFIK	VKKEKFLDEL	EKSK	
<b><i>C. difficile</i></b>	SLGMKGTHIR	ILNDKLTDEL	KKLKNNQ	

**Figure 16 : Alignement de la séquence de la protéine CodY de *St. thermophilus* avec les séquences protéiques CodY disponibles dans les banques de données**

*St.* : *Streptococcus* ; *S.* : *Staphylococcus* ; *C.* : *Clostridium* ; *E.* : *Enterococcus* ; *Lc.* : *Lactococcus* ; *B.* : *Bacillus*  
Le motif HTH est écrit en bleu.

Il est à noter que le régulateur CodY possède 63% d'identité au niveau protéique avec la protéine CodY de *Lc. lactis* ssp. *cremoris* SK11 et 50% avec son homologue présent chez *B. subtilis*. La plus forte identité observée entre les séquences protéiques CodY disponibles dans les banques de données se situe dans le domaine HTH (Hélice-Tour-Hélice) (Figure 16). C'est par ce domaine que la protéine CodY se fixe spécifiquement au motif de fixation nucléotidique : AATTTTCWGAAAATT (Serror et Sonenshein, 1996). Le motif de fixation de la protéine régulatrice CodY trouvé en amont du gène de *St. thermophilus* ressemble à celui de *Lc. lactis* mis en évidence par Den Hengst *et al.*, 2005.

Enfin, sachant que le régulateur transcriptionnel CcpA (catabolite control protein A), interagit avec des séquences particulières appelées *cre* (catabolite responsive element, (Van den Bogaard *et al.*, 2002; Luesink *et al.*, 1998; Saier *et al.*, 1996; Stülke et Hillen, 1999), ces séquences ont été recherchées en amont des gènes connus pour être régulés par CcpA, notamment chez *B. subtilis* (opéron *ilvDBN* et *ackA*) et chez *St. thermophilus* (le gène *ldh*). Elles ont ainsi été détectées en amont des gènes *ldh* et *ackA* (Tableau 23, Figure 17), ce dernier possède également une boîte CodY. Aucun site *cre* n'a été détecté en amont des gènes codant des enzymes de biosynthèse des acides aminés ramifiés (*ilvDBN*, *ilvC* et *bcaT*).

**Tableau 23 : Localisation et séquence des boîtes *cre* « catabolite responsive element » identifiées au niveau des gènes potentiellement régulés par CcpA chez *St. thermophilus* PB180 et PB302**

Gène	Séquence <i>cre</i> <sup>a</sup>	Distance/ATG <sup>b</sup>
<i>ackA</i>	TGAAAGCGTTTTAT	-12
<i>ldh</i>	T <u>T</u> AAAACGCTTTCA	-100

<sup>a</sup> : les résidus qui diffèrent de la séquence consensus *cre* (TGNNANCGNTNNCA) identifiée chez les bactéries à 2Gram<sup>+</sup> sont soulignés où N = A, T, G ou C (Hueck *et al.*, 1994).

<sup>b</sup> : position relative en paires de bases par rapport à l'ATG du gène correspondant, - en amont, + en aval.

```
AAATGCTCCTGAGACCTTCGTTTACCCACTTAGCGATTTGAAAAATCCAAGGGTCCTCAAGG
ATTTTACAGAGAATTTCCAAAAATGGAAATCAGATAATTCATTTTCTAGTAAAACATGATA
GAATAGGTATATATTATTGAAAGCGTTTTATAAAGAGGTGCTTATGACAAAAACAATAGCAA
TCAATGCAGGAAGTTCAAGCTTGAAATGGCAATTATATGAAATGCCAGAAGAG
```

**Figure 17 : Séquence de la région promotrice du gène *ackA* de *St. thermophilus* PB302 et PB180**

La boîte CodY potentielle est en caractères bleus (la séquence consensus de la boîte CodY « **AATTTTCWGAAAATT** » a été mise en évidence par Den Hengst *et al.*, 2005 chez *Lc. lactis*). La potentielle boîte -10 étendue du promoteur est soulignée. Le site *cre* et le codant start (**ATG**) sont indiqués en caractères rouges et roses respectivement. La séquence consensus de *cre* « catabolite responsive element » (**TGNNANCGNTNNCA**) a été identifiée par Hueck *et al.*, (1994) chez les bactéries à Gram<sup>+</sup> où une différence de deux nucléotides est autorisée dans toutes les positions sauf les deux nucléotides CG présents dans le centre.

### **3.2. Etude de l'expression des gènes sélectionnés chez *St. thermophilus* PB180 et PB302 par RT-PCR en temps réel**

Les ADNc utilisés pour quantifier les transcrits *prtS* ont été utilisés pour quantifier les transcrits des autres gènes ou opérons sélectionnés pour cette étude : *pepX*, *pepC*, *pepN*, *amiA<sub>1</sub>CDEF*, *dtpT*, *livJHMGF*, *ilvC*, *ilvDBN*, *bcaT*, *ackA*, *ldh*, *codY* et *relA* (dans le cas des opérons seule l'expression des gènes soulignés a été quantifiée par PCR en temps réel).

Dans cette expérience, comme c'était le cas pour la quantification des transcrits *prtS*, le gène  $\sigma_{70}/\sigma_{32}$  a été utilisé comme gène de référence, chaque réaction a été réalisée en triplicat et deux répétitions indépendantes ont été réalisées pour chaque milieu sauf pour le prélèvement effectué à pH 6 en lait pour la souche PB180. La moyenne de ces deux répétitions a été déterminée. Comme précédemment, seul un ratio d'expression supérieur à 2 ou inférieur à 0,5 et observé dans 2 expériences indépendantes, exception fait pour le point pH6 de la souche PB180 qui n'a été réalisé qu'une fois, a été considéré.

### **3.2.1. Taux d'expression des gènes sélectionnés au cours de la croissance des souches PB18O et PB302 en milieu M17**

Lorsque les taux d'expression des différents gènes sont comparés entre les deux souches (Tableau 24 ; Figures 18 et 19), il apparaît que la plupart sont exprimés de manière similaire, ce qui était attendu et cohérent compte tenu de la similitude des courbes de croissance des 2 souches en milieu M17 (Figure 12). Seuls quelques gènes apparaissent exprimés différemment. Il s'agit du gène *bcaT* qui est moins exprimé chez la souche PB302 aux 3 temps de croissance testés, du gène *amiF* (moins exprimé chez la souche PB302 en fin de phase exponentielle) et des gènes *ackA* et *livJ* qui sont plus exprimés en fin de phase exponentielle chez la souche PB302 (Tableau 24 ; Figures 18 et 19).

### **3.2.2. Expression relative des gènes sélectionnés au cours de la croissance des souches PB18O et PB302 en milieu lait**

Bien qu'il faille rester prudent sur l'interprétation des résultats obtenus en début de phase exponentielle (résultats non encore reproduits), la comparaison entre les souches PB302 et PB18O des taux d'expression des gènes sélectionnés a révélé des différences plus marquées qu'en milieu M17 (Tableau 24, Figure 20). Ainsi, en début de phase exponentielle, l'expression de 5 gènes (*ackA*, *codY*, *dtpT*, *ilvC* et *pepN*) pourrait être plus importante (facteur de 2 à 40) chez la souche PB302 (Tableau 24, Figure 20), sachant que la croissance de cette souche est bien meilleure en lait que celle de la souche PB18O (Figure 13). Au milieu de la phase exponentielle, presque la moitié des gènes testés sont davantage exprimés chez la souche PB302. Il s'agit des gènes *ackA*, *cod Y*, *ilvB*, *ilvC*, *livJ* et *relA* (Tableau 24, Figure 20).

Pour conclure, la différence de croissance observée entre les deux souches lorsqu'elles sont cultivées en lait se reflète au niveau de l'expression des gènes testés qui interviennent dans le métabolisme azoté. Si on inclut *prtS* dans cette analyse, l'expression de 7 gènes semble significativement augmentée chez la souche PB302 lorsqu'elle est cultivée en lait. Compte tenu des fonctions codées par ces gènes, cela pourrait expliquer, au moins en partie, la meilleure croissance de cette souche en lait, alors que la souche PB18O, qui pourtant

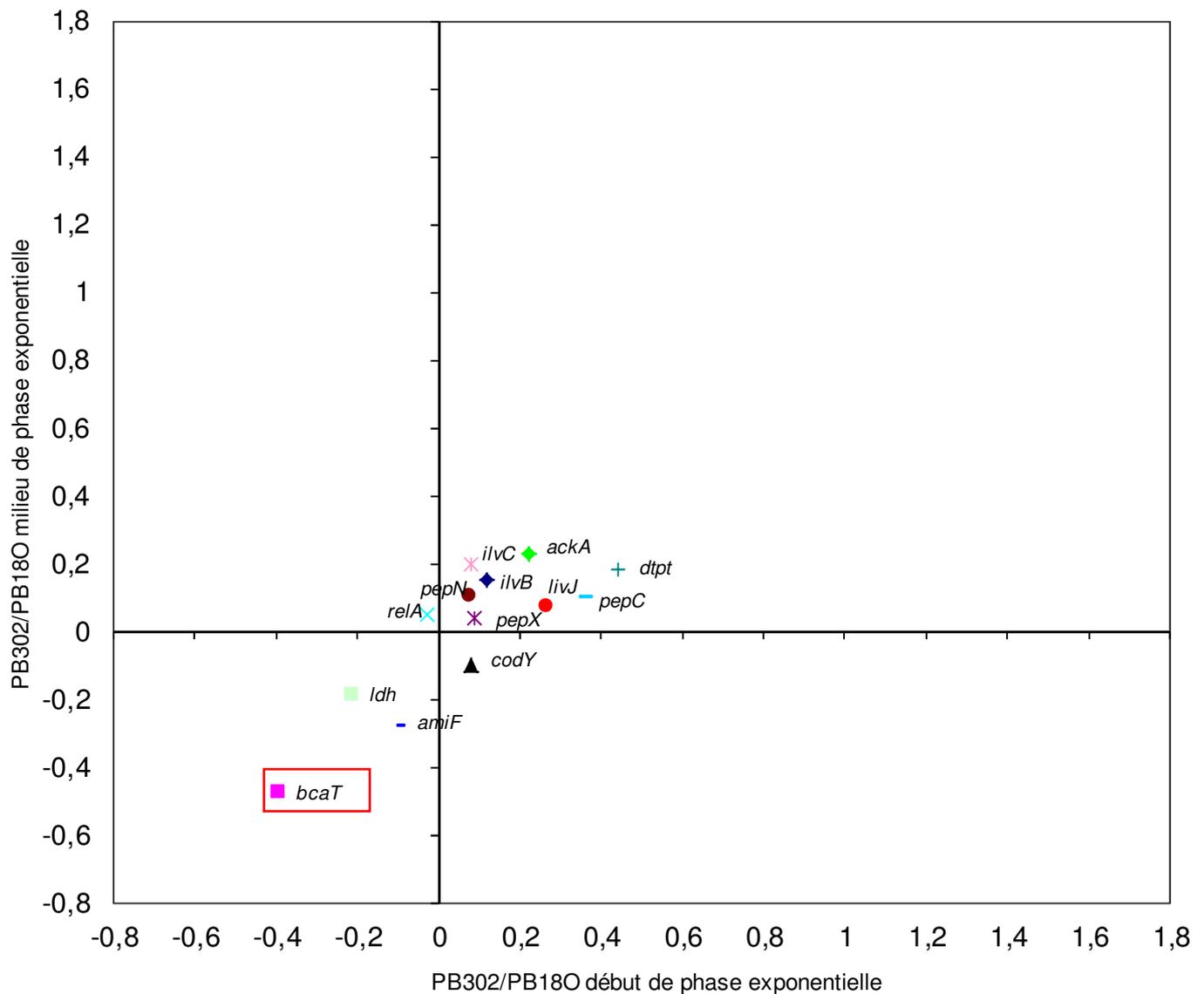
possède les mêmes versions alléliques de ces gènes, se développe beaucoup moins bien (Figure 13).

**Tableau 24 : Comparaison des niveaux d'expression des gènes étudiés entre les deux souches PB180 et PB302 (PB302/PB180\*) dans les deux milieux (milieu M17 et lait)**

	Milieu M17			Lait	
	Début de phase exponentielle	Milieu de phase exponentielle	Début de phase stationnaire	Début de phase exponentielle	Milieu de phase exponentielle
<i>ackA</i>	1,66 ± 1,09 (2,43 ; 0,89)	1,71 ± 0,24 (1,54 ; 1,88)	<b>2,03 ± 0,04</b> <b>(2,01 ; 2,06)</b>	<b>40,79</b>	<b>3,62 ± 2,19</b> <b>(5,17 ; 2,07)</b>
<i>amiF</i>	0,80 ± 0,04 (0,78 ; 0,83)	0,52 ± 0,17 (0,40 ; 0,64)	<b>0,19 ± 0,02</b> <b>(0,21 ; 0,18)</b>	0,88	1,11 ± 0,44 (0,79 ; 1,42)
<i>bcaT</i>	<b>0,40 ± 0,16</b> <b>(0,51 ; 0,28)</b>	<b>0,34 ± 0,11</b> <b>(0,41 ; 0,26)</b>	<b>0,28 ± 0,16</b> <b>(0,17 ; 0,39)</b>	0,86	1,40 ± 1,16 (0,58 ; 2,22)
<i>codY</i>	1,21 ± 0,95 (1,89 ; 0,54)	0,80 ± 0,10 (0,88 ; 0,73)	2,23 ± 0,60 (2,65 ; 1,80)	<b>2,43</b>	<b>3,92 ± 0,84</b> <b>(4,52 ; 3,32)</b>
<i>dtpT</i>	2,76 ± 2,50 (4,53 ; 0,99)	1,52 ± 0,27 (1,71 ; 1,33)	2,98 ± 1,98 (4,38 ; 1,58)	<b>3,34</b>	1,82 ± 1,33 (2,76 ; 0,88)
<i>ilvB</i>	1,33 ± 0,57 (0,93 ; 1,73)	1,42 ± 0,06 (1,46 ; 1,38)	1,43 ± 0,49 (1,08 ; 1,77)	1,55	<b>6,48 ± 5,16</b> <b>(2,84 ; 10,13)</b>
<i>ilvC</i>	1,19 ± 0,46 (1,52 ; 0,87)	1,59 ± 0,46 (1,92 ; 1,27)	1,90 ± 0,57 (1,50 ; 2,30)	<b>2,03</b>	<b>4,20 ± 0,73</b> <b>(4,71 ; 3,68)</b>
<i>ldh</i>	0,60 ± 0,15 (0,70 ; 0,49)	0,65 ± 0,24 (0,82 ; 0,48)	0,86 ± 0,10 (0,94 ; 0,79)	0,98	1,13 ± 0,59 (0,71 ; 1,55)
<i>livJ</i>	1,84 ± 0,64 (2,29 ; 1,39)	1,19 ± 0,83 (1,77 ; 0,60)	<b>7,28 ± 2,62</b> <b>(5,43 ; 9,13)</b>	0,91	<b>2,71 ± 0,06</b> <b>(2,66 ; 2,75)</b>
<i>pepC</i>	2,31 ± 1,21 (3,16 ; 1,45)	1,27 ± 0,48 (0,94 ; 1,61)	1,54 ± 0,91 (0,90 ; 2,19)	0,65	2,25 ± 1,92 (0,90 ; 3,61)
<i>pepX</i>	1,23 ± 0,21 (1,08 ; 1,38)	1,09 ± 0,20 (0,94 ; 1,23)	1,75 ± 0,21 (1,90 ; 1,60)	0,50	0,88 ± 0,47 (1,13 ; 0,55)
<i>pepN</i>	1,18 ± 0,36 (0,93 ; 1,44)	1,30 ± 0,56 (0,90 ; 1,69)	0,82 ± 0,13 (0,73 ; 0,91)	<b>2,87</b>	1,06 ± 0,10 (1,13 ; 0,99)
<i>relA</i>	0,94 ± 0,35 (1,18 ; 0,69)	1,11 ± 0,16 (1,22 ; 1,0)	1,38 ± 0,29 (1,17 ; 1,58)	1,11	<b>2,65 ± 0,69</b> <b>(2,16 ; 3,14)</b>

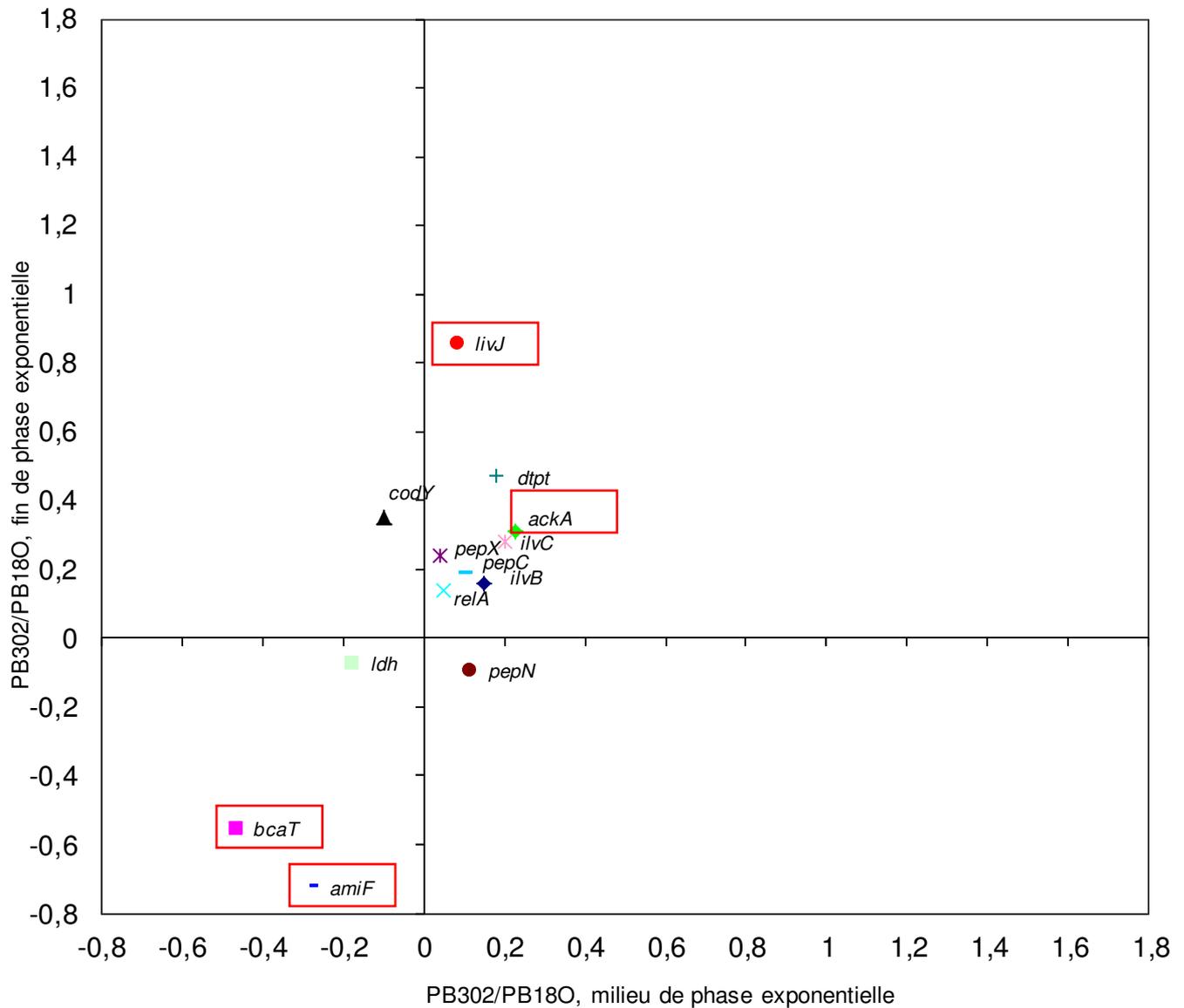
\*Pour des raisons techniques le point pH 6 en lait n'a pas été reproduit chez la souche PB180.

La moyenne et l'écart type déduits des taux obtenus pour les deux expériences indépendantes sont présentés ainsi que les valeurs des taux obtenus pour chacune des expériences (voir entre parenthèses). Les taux indiqués en caractères gras et rouges correspondent à ceux qui ont été considérés comme significatifs et donc pris en compte dans l'analyse.



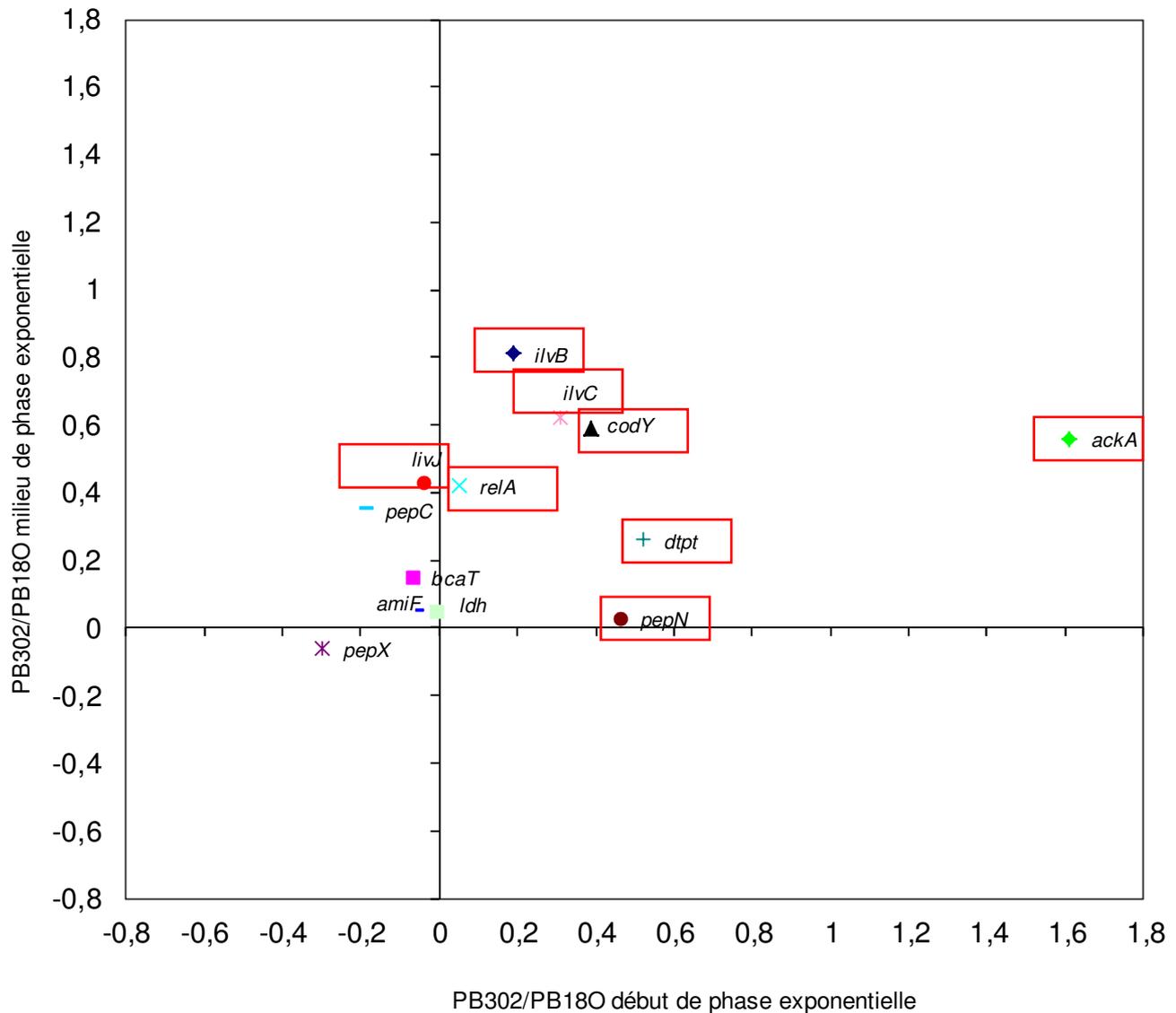
**Figure 18 :  $\text{Log}_{10}$  du rapport d'expression de chacun des gènes d'intérêt déterminé chez les souches PB302 et PB180 (PB302/PB180) au début et au milieu de la phase exponentielle de croissance en milieu M17**

Les valeurs positives indiquent une augmentation de l'expression du gène cible chez la souche PB302 par rapport à la souche PB180 et les valeurs négatives indiquent une diminution de l'expression du gène cible. Chaque taux est la moyenne de deux expériences indépendantes. Une augmentation d'un facteur 2 correspond à une valeur de 0,3 ( $\text{Log}_{10} 2 = 0,3$ ) et une diminution d'un facteur 2 correspond à une valeur de -0,3 ( $\text{Log}_{10} 0,5 = -0,3$ ).



**Figure 19 :  $\text{Log}_{10}$  du rapport d'expression de chacun des gènes d'intérêt déterminé chez les souches PB302 et PB180 (PB302/PB180) au milieu et à la fin de la phase exponentielle (début de phase stationnaire de croissance) en milieu M17**

Les valeurs positives indiquent une augmentation de l'expression du gène cible chez la souche PB302 par rapport à la souche PB180 et les valeurs négatives indiquent une diminution de l'expression du gène cible. Chaque taux est la moyenne de deux expériences indépendantes. Une augmentation d'un facteur 2 correspond à une valeur de 0,3 ( $\text{Log}_{10} 2 = 0,3$ ) et une diminution d'un facteur 2 correspond à une valeur de -0,3 ( $\text{Log}_{10} 0,5 = -0,3$ ).



**Figure 20 :  $\text{Log}_{10}$  du rapport d'expression de chacun des gènes d'intérêt déterminé chez les souches PB302 et PB180 (PB302/PB180) au début et au milieu de la phase exponentielle de croissance en lait**

Les valeurs positives indiquent une surexpression du gène cible chez la souche PB302 par rapport à la souche PB180. Les valeurs négatives indiquent une diminution de l'expression du gène cible chez la souche PB302 par rapport à la souche PB180. Une augmentation d'un facteur 2 correspond à une valeur de 0,3 ( $\text{Log}_{10} 2 = 0,3$ ) et une diminution d'un facteur 2 correspond à une valeur de -0,3 ( $\text{Log}_{10} 0,5 = -0,3$ ).

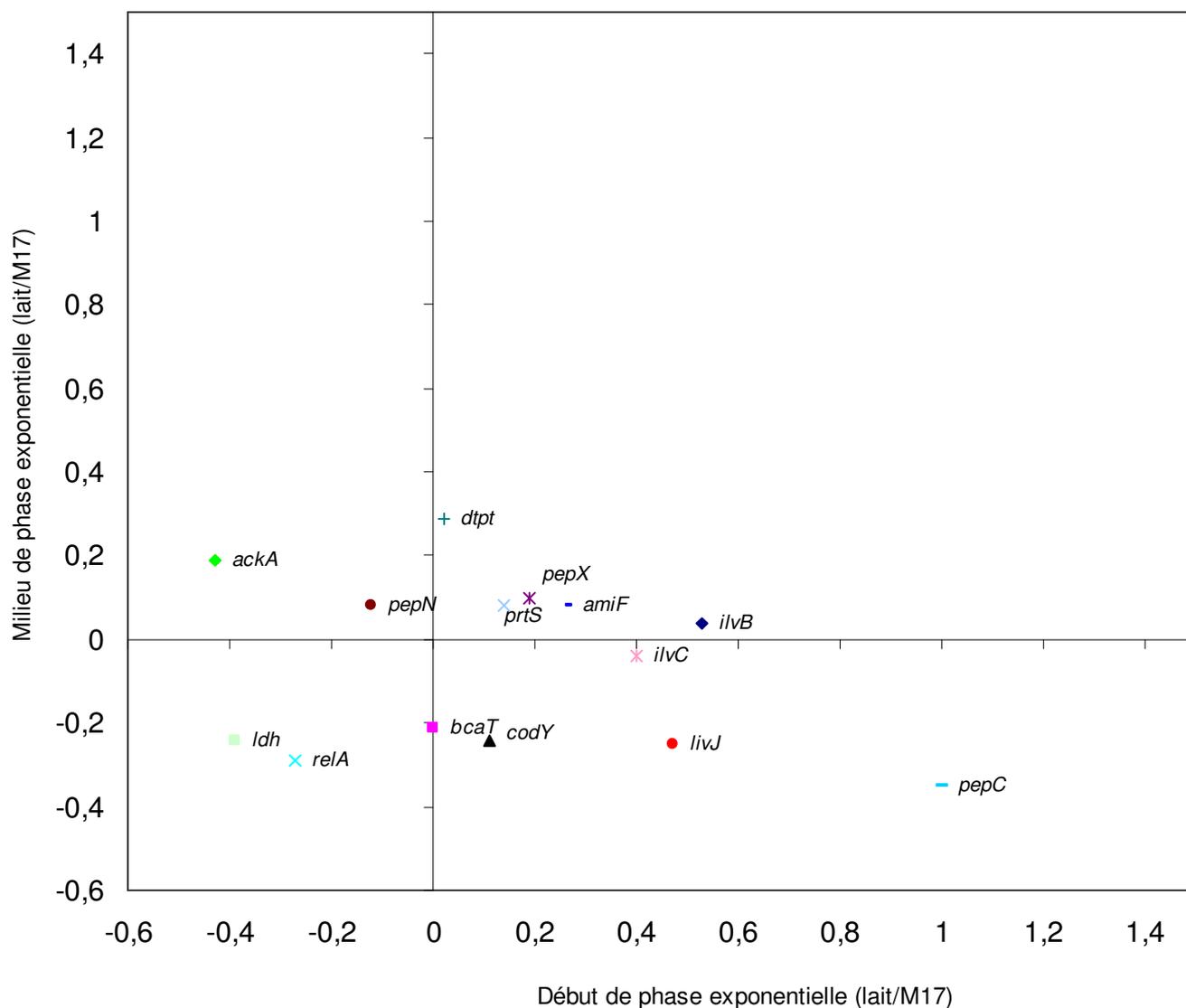
## 4. Conclusion-Discussion

Les résultats présentés dans le chapitre 1 ont permis de montrer qu'une partie de la variabilité du potentiel protéolytique de surface de *St. thermophilus* consiste en la faible ou non-expression du gène *prtS* chez certaines souches, alors que d'après sa séquence ce gène apparaît fonctionnel. Lorsqu'elles sont cultivées en lait, ces souches présentent par ailleurs des capacités acidifiantes, reflet de leur croissance, inférieures à celles des souches qui possèdent le gène *prtS* et qui expriment la protéase. Ceci nous a amenés à :

1. étudier l'expression du gène *prtS* chez deux souches (PB18O et PB302) qui possèdent le même allèle *prtS* mais qui expriment différemment la protéase ;
2. étudier chez ces deux souches l'expression d'autres gènes du métabolisme azoté pouvant appartenir ou non au même régulon.

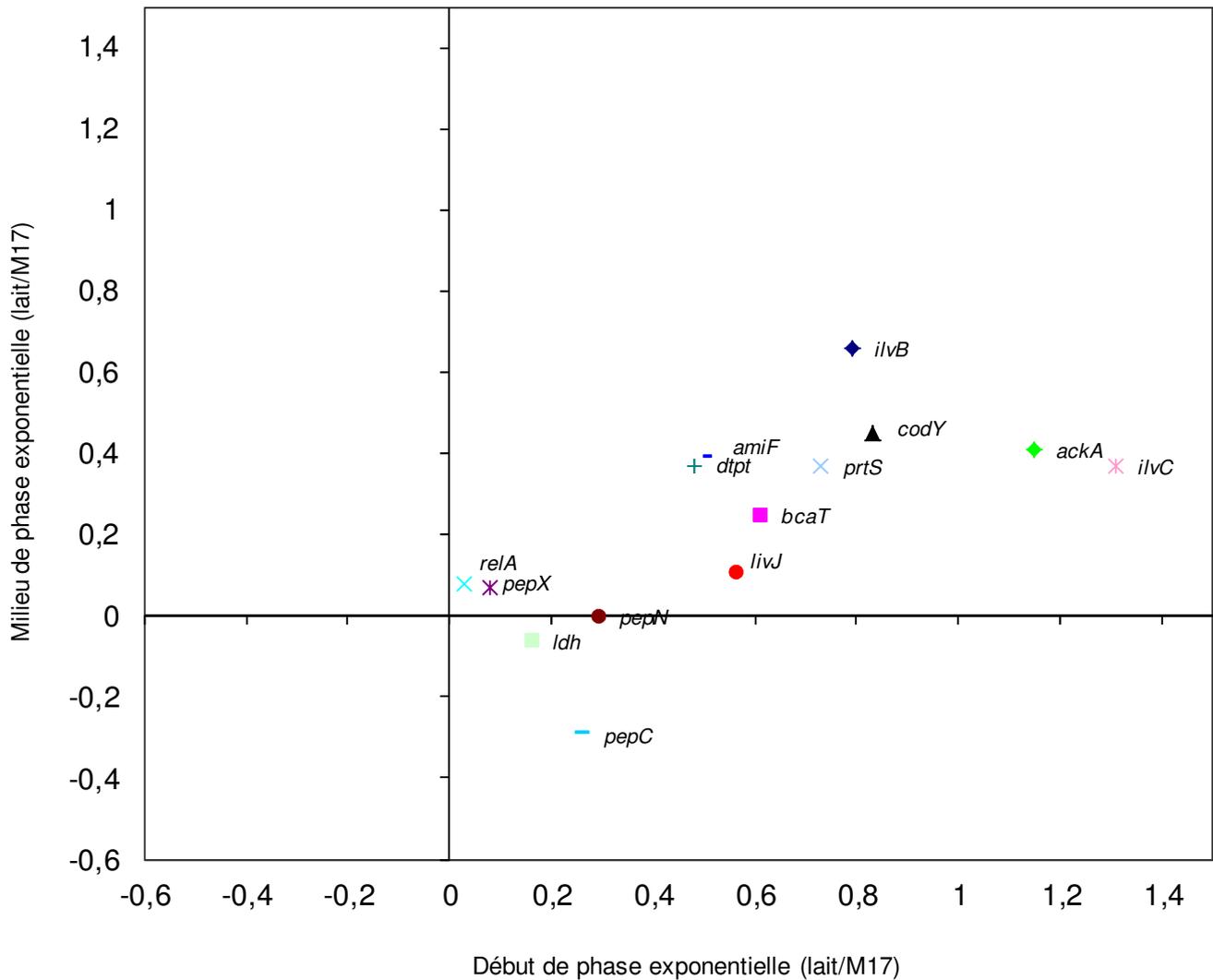
Ces études ont été réalisées dans deux milieux différents : le milieu M17 couramment utilisé pour cultiver au laboratoire *St. thermophilus* et le lait. La nature de la source azotée diffère entre les deux milieux puisque dans le cas du milieu M17 elle consiste en des peptides et acides aminés libres, alors que dans le cas du lait, il s'agit de protéines complexes. Pour les deux milieux testés, la source de carbone est le lactose.

En milieu M17, nous avons observé que l'expression du gène *prtS* et l'activité de la protéase semble plus importante chez la souche PB302. Quand l'ensemble des gènes testés est considéré, il a été constaté que la plupart de ces gènes sont exprimés à des taux similaires chez les 2 souches, exception faite des gènes *ackA*, *bcaT*, *amiF*, *livJ* et *prtS*. Comme cela a été dit précédemment, ces résultats sont cohérents avec le fait que les courbes de croissance des 2 souches sont similaires en milieu M17. En milieu lait, la croissance des souches est très différente, comme cela était attendu compte tenu du pouvoir acidifiant de chacune d'entre-elles, et l'expression du gène *prtS* et d'un bon nombre des gènes du métabolisme azoté testés également.



**Figure 21 : Log<sub>10</sub> du rapport d'expression de chacun des gènes d'intérêt déterminé chez la souche PB180 cultivée en lait et M17 (lait/M17) au début et au milieu de la phase exponentielle de croissance**

Les valeurs positives indiquent une induction d'expression du gène cible en lait par rapport au milieu M17 et les valeurs négatives indiquent une répression de l'expression des gènes entre les deux milieux (lait/milieu M17). Une augmentation d'un facteur 2 correspond à une valeur de 0,3 ( $\text{Log}_{10} 2 = 0,3$ ) et une diminution d'un facteur 2 correspond à une valeur de -0,3 ( $\text{Log}_{10} 0,5 = -0,3$ ).



**Figure 22 :  $\log_{10}$  du rapport d'expression de chacun des gènes d'intérêt déterminé chez la souche PB302 cultivée en lait et M17 (lait/M17) au début et au milieu de la phase exponentielle de croissance**

Les valeurs positives indiquent une induction d'expression du gène cible en lait par rapport au milieu M17 et les valeurs négatives indiquent une répression de l'expression des gènes entre les deux milieux (lait/milieu M17). Une augmentation d'un facteur 2 correspond à une valeur de 0,3 ( $\log_{10} 2 = 0,3$ ) et une diminution d'un facteur 2 correspond à une valeur de -0,3 ( $\log_{10} 0,5 = -0,3$ ).

#### **4.1. Expression de la protéase PrtS au cours de la croissance des souches PB18O et PB302**

Chez les souches PB18O et PB302 et dans les deux milieux testés, la protéase PrtS est exprimée dès le début de la phase exponentielle. Par contre, en milieu M17, l'expression de ce gène augmente en fin de phase exponentielle/début de phase stationnaire d'un facteur 2 chez la souche PB302 ce qui ne semble pas être le cas chez la souche PB18O (Tableau 16). Quand le niveau d'expression du gène *prtS* est comparé entre les deux souches, il est constaté que dans chacun des deux milieux testés, il est plus important chez la souche PB302 (Tableaux 17 et 21), ce qui est cohérent avec l'activité protéolytique de surface observée chez les deux souches (Tableaux 14 et 18).

L'étude de la croissance en lait de différentes souches de *St. thermophilus*, possédant ou non PrtS, a révélé que les souches possédant PrtS présentent une croissance diauxique en lait et que PrtS était seulement exprimée au cours de la deuxième phase exponentielle (Letort *et al.*, 2002). Les auteurs proposent qu'au cours de la première phase exponentielle les bactéries utilisent les acides aminés et les petits peptides du lait et n'expriment pas la protéase PrtS ; alors que pendant la deuxième phase exponentielle de croissance, phase au cours de laquelle PrtS est exprimée, la bactérie aurait besoin d'utiliser les caséines comme source d'acides aminés. Cette croissance diauxique n'a pas été observée dans le cas des souches PB302 et PB18O et, comme en milieu M17, l'expression de PrtS a été détectée dès le début de la croissance. De même, il est à noter que pour les autres souches PrtS<sup>+</sup> de notre collection, l'activité de PrtS est détectée dès le début de croissance. Ces résultats suggèrent donc que la régulation du gène *prtS* pourrait varier d'une souche à l'autre au sein de l'espèce *St. thermophilus*.

La croissance en lait de *St. thermophilus* est dépendante soit de sa capacité à hydrolyser les protéines du lait ou du degré de protéolyse naturelle du lait. Il est ainsi très difficile d'une préparation de milieu lait à une autre d'avoir le même degré de protéolyse et donc une parfaite reproductibilité des résultats tant au niveau croissance bactérienne qu'expression des gènes. Cela est encore plus frappant lorsque sont comparés des taux d'expression de gènes lors de la croissance de *St. thermophilus* dans 2 milieux différents tels que le milieu M17 et le lait. Cependant, et même s'il convient de rester prudent quant à la validité des interprétations, cette comparaison peut permettre d'identifier des gènes dont l'expression pourrait être importante pour la croissance en lait de *St. thermophilus*. Nous

avons ainsi fait cette comparaison pour chacune des 2 souches et pour les 2 temps de croissance de phase exponentielle testés (Figures 21 et 22). L'activité de PrtS apparaît supérieure quand les souches PB18O et PB302 sont cultivées en lait. Dans le cas de la souche PB302, le taux de transcription du gène *prtS* apparaît supérieur en lait alors qu'il semble similaire dans les 2 milieux chez la souche PB18O. Ainsi, si la plus forte activité PrtS observée en milieu lait chez la souche PB302 est cohérente avec le plus fort taux de transcription de ce gène, cela n'est pas le cas pour la souche PB18O. Cela pourrait provenir d'une régulation traductionnelle différente chez cette souche ou être lié à la sécrétion maturation de la protéase, maturation qui demeure inconnue. Si le gène *prtS* a été acquis par transfert horizontal de *St. suis*, la protéase PrtS diffère néanmoins de son homologue présent chez *St. suis* et possède une spécificité propre à *St. thermophilus*. En effet, une duplication de 32 résidus d'acides aminés est présente dans le pro-domaine de la protéase codée par l'allèle le plus fréquemment rencontré chez *St. thermophilus*, à savoir celui présent dans la souche LMD-9 (Delorme *et al.*, 2010; Galia *et al.*, 2009). Le pro-domaine de certaines protéines est la cible d'isomérases appelées peptidyl-prolyl cis-trans isomérases (PPIases). Il s'agit de foldases qui accélèrent le changement conformationnel cis/trans au niveau des liaisons peptidyl-proline (Xaa-Pro) qui se trouvent dans le pro-domaine de certaines protéines (Hermans *et al.*, 2006; Rahfeld *et al.*, 1994). Une telle isomérisation pourrait être importante pour le repliement correct et efficace des protéines de surface (Drouault *et al.*, 2002). La présence d'une duplication au niveau du pro-domaine du gène *prtS*, pourrait être une forme d'adaptation de la protéase PrtS aux isomérases présentes chez *St. thermophilus*.

L'analyse des génomes de trois souches de *St. thermophilus*, (CNRZ1066, LMG18311 et LMD-9) montre la présence de quatre PPIases putatives. Deux appartiennent à la famille des cyclophilines et sont annotées comme étant des rotamases (STER\_0545 et STER\_0676). La troisième (STER\_0191), appartient à la famille FKBP. Il s'agit d'un facteur d'adressage (RopA) de 427 résidus d'acides aminés avec des pourcentages d'identité de 95 ; 79 et 77% avec ces homologues de *St. salivarius* SK126, *St. suis* 89/1591 et *St. pyogenes* MGAS10394. Le facteur RopA est considéré comme responsable de la sécrétion de plusieurs facteurs de virulence (Lyon *et al.*, 1998). Chez *St. pyogenes*, la protéase à cystéine (SpeB) est sécrétée et maturée grâce au facteur RopA. Lyon et Caparon., (2003) proposent qu'au cours de la traduction de l'ARNm de la protéase, le facteur RopA se lie à la protéase par ces deux extrémités N et C terminales. Cette interaction serait essentielle pour stabiliser la préprotéase dans une conformation optimale pour la sécrétion. Puis, le complexe (facteur RopA/préprotéase) serait adressé vers la bonne voie de sécrétion à travers la membrane

cellulaire. Au cours de cette interaction, le domaine central du facteur RopA ayant une activité PPIase entraînerait l'isomérisation du résidu prolyl situé en position 78 du pro-domaine, isomérisation qui permettrait à la protéase sécrétée de se replier dans sa forme zymogène (Lyon et Caparon, 2003). Ainsi, l'état d'isomérisation du résidu prolyl et l'emplacement de ce résidu dans le pro-domaine pourraient influencer la conformation du pro-domaine qui dirige à son tour la protéase dans un des chemins de repliement alternatif (Lyon et Caparon, 2003). S'il existe un lien direct entre le facteur RopA et la sécrétion/maturation de la protéase PrtS chez *St. thermophilus*, nous pouvons envisager que la présence de la duplication pourrait permettre au résidu prolyl, cible potentielle de ce facteur, d'être correctement positionné dans le pro-domaine, et/ou influencer la conformation du pro-domaine d'une manière adaptée au système de sécrétion présent chez *St. thermophilus*. Une déficience même transitoire de l'activité RopA pourrait alors aboutir à la diminution de l'efficacité de sécrétion/maturation de PrtS.

La quatrième isomérase (STER\_0492) est codée par un gène homologue du gène *pmpA* de *Lc. lactis* et a été annotée *prtM* chez *St. thermophilus*. La protéine putative PrtM est constituée de 380 résidus d'acides aminés avec des pourcentages d'identité de 95 ; 39 ; 35 et 39% avec ses homologues de *St. salivarius* SK126, *St. suis* 89/1591, *St. pyogenes* MGAS10394 et *St. pneumoniae* TCH8431/19A. La protéine PrtM de *St. thermophilus* LMD-9 présente 34% d'identité avec son homologue PmpA de *Lc. lactis* ssp. *cremoris* MG1363 et seulement 24% avec la protéine PrtM de *Lc. lactis*, impliquée dans la maturation de la protéase PrtP (Haandrikman *et al.*, 1989). Il est à souligner que les gènes *prsA*-like (*plp*) tel que le gène *pmpA* sont reconnus par leur faible pourcentage d'homologie entre eux (Drouault *et al.*, 2002). Par homologie de séquence, la protéine PmpA de *Lc. lactis* pourrait avoir une activité de foldase qui faciliterait la sécrétion des protéines (Drouault *et al.*, 2002). Il a été constaté que la transcription du gène *pmpA* est augmentée lorsque la source azotée est limitée. Ces résultats suggèrent que l'expression du gène *pmpA* est nécessaire pour le repliement des facteurs impliqués dans la nutrition azotée, tels que la protéase de paroi cellulaire ou les trois systèmes de transport de peptides Opp, DtpT et DtpP qui sont induits dans les mêmes conditions (Drouault *et al.*, 2002; Guédon *et al.*, 2001b). D'une manière similaire aux deux protéines PmpA et PrtM identifiées chez *Lc. lactis*, la protéine PrtM de *St. thermophilus* pourrait avoir une activité de foldase qui faciliterait la sécrétion et la maturation des protéines de surface dont la protéase PrtS, soit de manière directe, soit *via* un rôle dans le repliement de certains facteurs impliqués dans la sécrétion et/ou la maturation des protéines de surface. Dans ce cas, l'augmentation de l'expression du gène *prtM* en milieu lait pourrait expliquer

l'augmentation de l'activité PrtS observée lors de la croissance de la souche PB18O en lait, alors que le gène *prtS* n'est pas plus exprimé qu'en milieu M17.

## **4.2. Variation de l'expression de gènes du métabolisme azoté au cours de la croissance des souches PB302 et PB18O : rôle du régulateur CodY chez *St. thermophilus***

L'expression d'autres gènes impliqués, pour la plupart, dans le métabolisme azoté a été étudiée chez les souches PB18O et PB302 cultivées en milieu M17 et lait. Il s'agit de gènes codant des régulateurs (*relA* et *codY*), des transporteurs de peptides (opéron *ami* et *dtpt*), des peptidases intracellulaires (*pepX*, *pepN* et *pepC*), des gènes intervenant dans la synthèse d'acides aminés branchés (*bcaT*), dans leur transport (opéron *livJHMG*) ou dans la synthèse de leurs précurseurs (*ilvDBN*, *ilvC*). Enfin, deux gènes impliqués dans le métabolisme glucidique (*ldh*, *ackA*) ont été étudiés. Le séquençage de ces gènes a révélé qu'ils sont présents dans les deux souches et que celles-ci portent pour chacun des gènes étudiés la même version allélique. Le gène *codY* est présent chez les deux souches étudiées PB18O et PB302 avec une parfaite identité entre elles sur la partie codante mais aussi au niveau des régions promotrice et terminatrice. La plus forte identité entre la séquence protéique de CodY de *Lc. lactis* et celle déduite à partir de la séquence nucléotidique de *St. thermophilus* a été trouvée dans le domaine HTH (Hélice-Tour-Hélice). Le motif de fixation de la protéine régulatrice CodY chez *St. thermophilus* ressemblerait donc à celui de *Lc. lactis* (AATTTTCWGAAAATT) mis en évidence par Den Hengst *et al.*, 2005. L'analyse de la séquence promotrice des gènes étudiés a révélé que la plupart d'entre-eux possèdent une boîte CodY ressemblant à celle reconnue par la protéine CodY de *Lc. lactis*. Il s'agit des opérons *amiA<sub>1</sub>CDEF*, *livJHMG* et *ilvDBN*, et des gènes *pepX*, *pepN*, *pepC*, *bcaT*, *ilvC*, *ackA* et du gène *codY* lui-même (Tableau 22). De plus, le gène *prtS* possède également une boîte CodY. Un seul motif de fixation de CodY a été détecté en amont de chaque gène. Une séquence de 864 pb en amont du gène *prtS* a été obtenue. L'analyse de cette séquence a montré une identité de 100% entre les deux souches étudiées et ne nous a pas permis de mettre en évidence un deuxième motif de fixation de la protéine CodY. Cette situation est différente de celle décrite chez *Lc. lactis* où plusieurs copies de la boîte CodY ont été détectées en amont des gènes et/ou opérons fortement régulés par CodY (den Hengst *et al.*, 2005b). Deux copies sont présentes dans la région promotrice de *dppA*, *oppA* et *ilvD*, alors que trois ont été proposées chez le gène *gltA* codant la citrate synthétase. Chez

*St. thermophilus*, une interaction entre la protéine CodY et les promoteurs des gènes *prtS*, *pepN*, *pepC*, *pepX* et de l'opéron *ami* a été démontrée *in vitro* (Liu *et al.*, 2009). Ainsi sur la base de ces données, tous les gènes présentant une boîte CodY dont l'expression a été étudiée dans ce travail, pourraient appartenir au même régulon : le régulon CodY.

#### **4.2.1. Comparaison de l'expression des gènes sélectionnés chez les deux souches PB302 et PB180**

Sur les deux phases étudiées dans les deux milieux de croissance (début et milieu de la phase exponentielle), les différences d'expression des gènes étudiés entre les deux souches (PB302 vs PB180) apparaissent beaucoup plus prononcées en lait qu'en milieu M17 (Figures 23 et 24). L'analyse de l'expression de ces gènes permet :

1. en comparant pour chaque souche l'expression de ces gènes en milieu lait et M17, de déterminer ceux qui pourraient être importants lors de la croissance en lait, tout en restant prudent sur les conclusions pour les raisons évoquées précédemment ;
2. de déterminer si les gènes exprimés différemment peuvent appartenir au même régulon et tenter de comprendre le rôle du régulateur dont leur expression dépend.

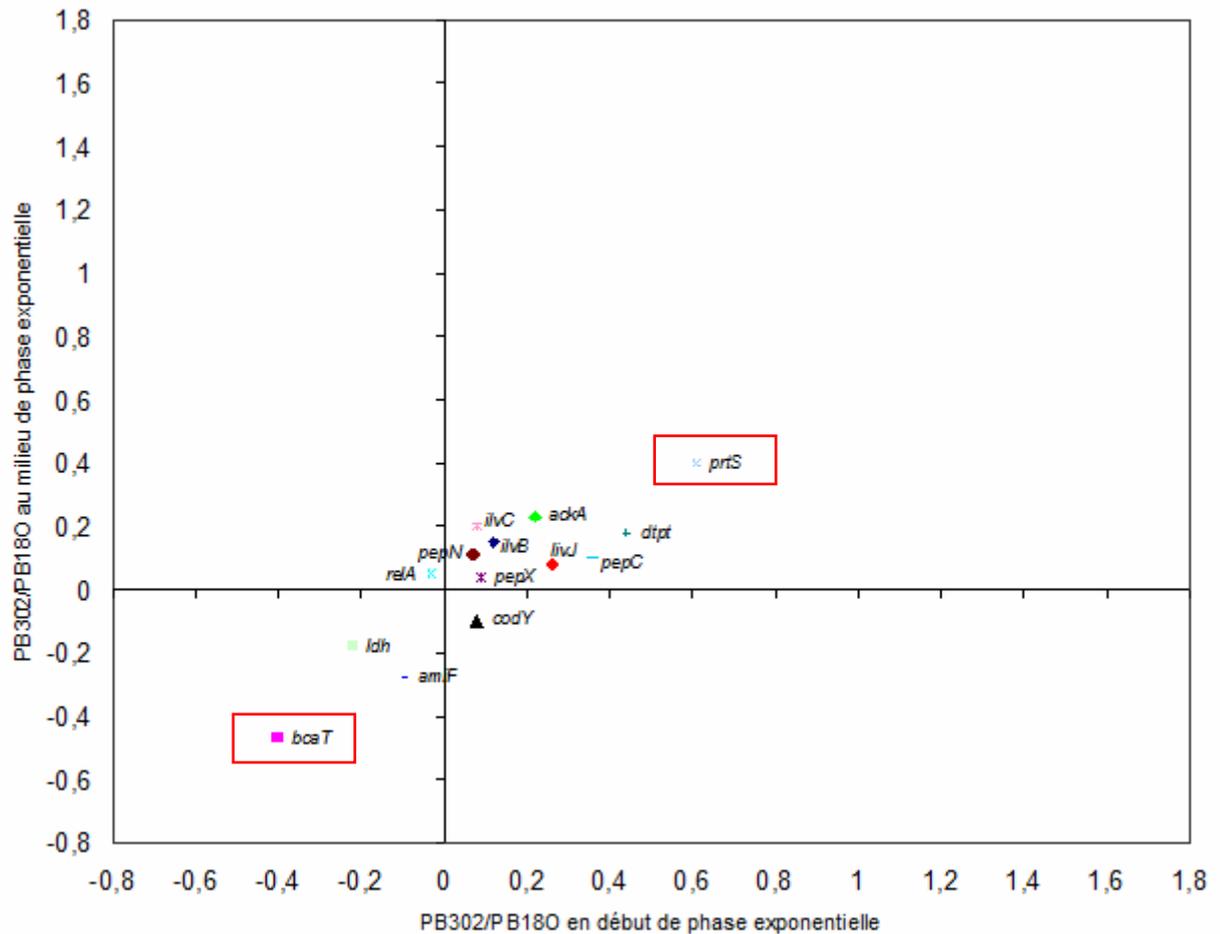
La comparaison des taux d'expression des gènes sélectionnés chez la souche PB302 (*prtS* inclus) en lait versus M17 suggère que les gènes *codY*, *dtpt*, *amiF*, *ilvC*, *ilvB*, *bcaT*, *livJ*, *prtS* et *ackA* soient surexprimés quand la souche est cultivée en lait (Figure 22). Les deux gènes *bcaT* et *livJ* seraient surexprimés seulement au début de la phase exponentielle. À l'exception du gène *dtpt*, tous ces gènes possèdent une boîte CodY potentielle et pourraient donc appartenir au même régulon. Sur les deux phases étudiées, aucun gène étudié n'est moins exprimé en lait qu'en milieu M17 chez la souche PB302 (Figure 22). Chez la souche PB180, en début de phase exponentielle les gènes *ilvC*, *ilvB*, *livJ* et *pepC* pourraient être surexprimés et les gènes *ackA* et *ldh* sous-exprimés (Figure 21). Alors qu'en milieu de phase exponentielle, l'expression des gènes étudiés entre les deux milieux reste relativement constante (Figure 21). Compte tenu de la différence de croissance des 2 souches en lait, les gènes induits dans la souche PB302 cultivée en lait pourraient être importants pour la croissance de cette souche dans ce milieu et la non induction d'une partie d'entre-eux (*codY*, *dtpt*, *bcaT*, *ackA*, *prtS* et l'opéron *ami*) pourrait être, au moins en partie, responsable de la mauvaise croissance de la souche PB180 dans ce milieu.

Etant donné l'importance des BCAA pour la croissance de *St. thermophilus* en lait (Garault *et*

*al.*, 2000), il n'est pas étonnant que les gènes impliqués dans la synthèse ou le transport des BCAA soient induits chez une souche présentant une bonne croissance en lait, comme c'est le cas de la souche PB302. De la même manière, étant donné la nature (protéines complexes) de la source azotée du lait, l'induction de PrtS ou de transporteurs de peptides est tout à fait cohérente. Un des gènes avec le plus haut niveau de surexpression (14 fois) est le gène codant l'acétate kinase (*ackA*). Cette enzyme joue un double rôle dans la cellule. Tout d'abord, à partir de l'acétyl-CoA, l'activité phosphotransacétylase couplée avec celle de l'acétate kinase produisent de l'acétate qui sera excrétée (Figure 15). C'est un moyen pour éliminer l'accumulation des produits finaux du métabolisme du lactose (par exemple pyruvate et acétyl-CoA). Cette activité peut aussi être une source importante d'ATP au cours de la fermentation (Dauner *et al.*, 2001).

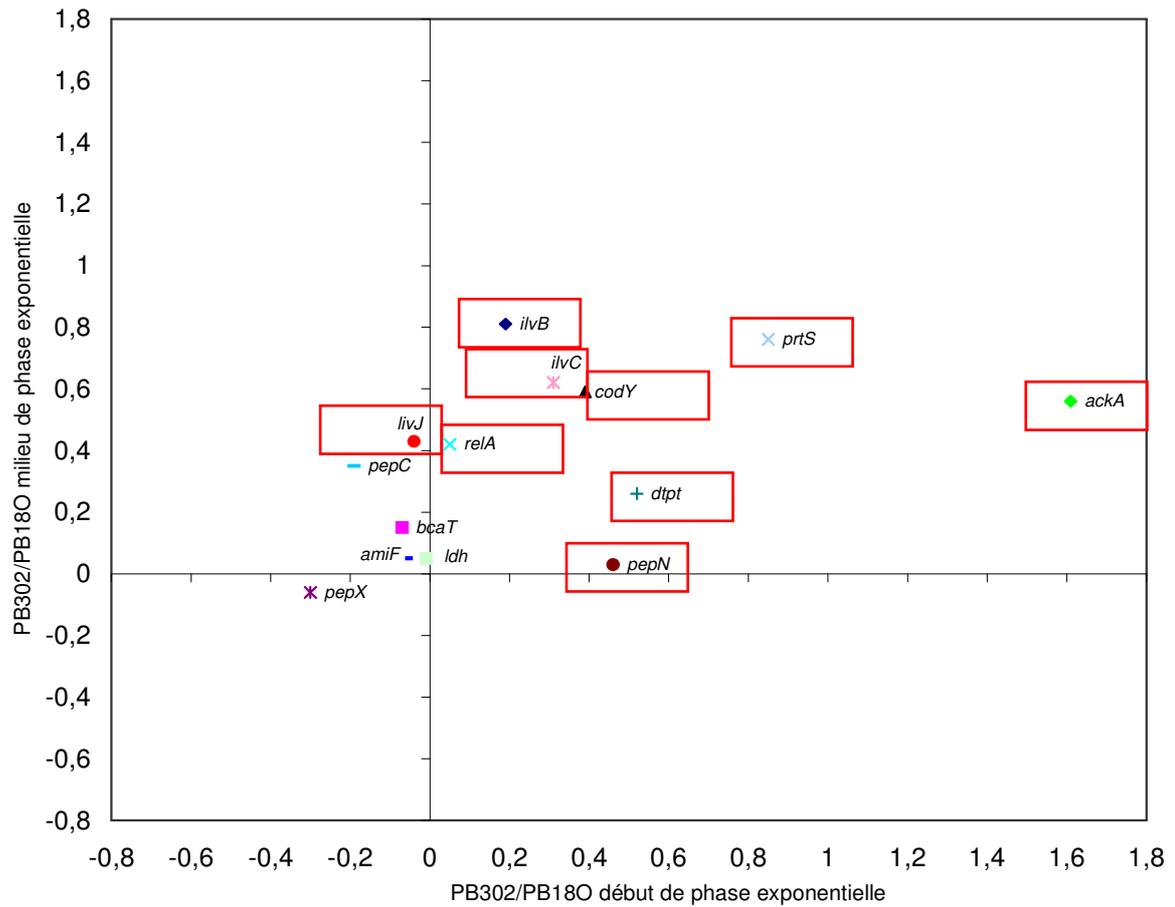
#### **4.2.2. Quel est le rôle du régulateur CodY chez *St. thermophilus* : activateur et/ou répresseur ?**

Le régulateur transcriptionnel (CodY) a été décrit dans plusieurs espèces bactériennes à Gram<sup>+</sup> à bas pourcentage en bases G et C. Il contrôle la transcription d'une dizaine de gènes en réponse à la richesse du milieu en acides aminés ramifiés et/ou GTP (Guédon *et al.*, 2001a, 2001b; den Hengst *et al.*, 2005a, 2005b; Serror et Sonenshein, 1996). Grâce à son motif hélice-tour-hélice (HTH), la protéine CodY est capable de se fixer à l'ADN et réguler des gènes et des opérons d'une manière directe (Serror et Sonenshein, 1996). Chez *Lc. lactis*, CodY est connu pour réguler négativement l'expression de certains gènes codant des protéines participant à la protéolyse et des fonctions liées à l'approvisionnement d'azote (Guédon *et al.*, 2001a, 2001b; den Hengst *et al.*, 2005a, 2005b).



**Figure 23 :  $\text{Log}_{10}$  du rapport d'expression de chacun des gènes d'intérêt déterminé chez les souches PB302 et PB180 ( $\text{PB302/PB180}$ ) au début et au milieu de la phase exponentielle de croissance en milieu M17**

Les valeurs positives indiquent une surexpression du gène cible chez la souche PB302 et les valeurs négatives une diminution. Une augmentation d'un facteur 2 correspond à une valeur de 0,3 ( $\text{Log}_{10} 2 = 0,3$ ) et une diminution d'un facteur 2 correspond à une valeur de -0,3 ( $\text{Log}_{10} 0,5 = -0,3$ ).



**Figure 24 : Log<sub>10</sub> du rapport d'expression de chacun des gènes d'intérêt déterminé chez les souches PB302 et PB180 (PB302/PB180) au début et au milieu de la phase exponentielle de croissance en lait**

Les valeurs positives indiquent une surexpression du gène cible chez la souche PB302 et les valeurs négatives indiquent une diminution. Une augmentation d'un facteur 2 correspond à une valeur de 0,3 ( $\text{Log}_{10} 2 = 0,3$ ) et une diminution d'un facteur 2 correspond à une valeur de -0,3 ( $\text{Log}_{10} 0,5 = -0,3$ ).

Chez les streptocoques pathogènes, le rôle du régulateur CodY semble plus complexe puisqu'il peut jouer le rôle de répresseur ou d'activateur. Chez *St. pneumoniae*, Hendriksen *et al.*, (2008) ont ainsi démontré que l'expression du gène codant la protéine de liaison à la choline, la protéine PcpA, est réprimée chez le mutant *codY*. Chez *St. pyogenes*, CodY est impliqué dans une régulation transcriptionnelle positive ou négative de plusieurs gènes, dépendante de la phase de croissance et de l'état nutritionnel de bactérie (Malke *et al.*, 2006a). Ainsi, chez *St. pyogenes* CodY joue un rôle dans l'activation des gènes de virulence en milieu de phase exponentielle dans un milieu complexe. Dans ces conditions, CodY renforce la transcription de l'activateur pléiotrope *mga*, avec une forte régulation positive simultanée d'au moins 6 facteurs de virulence (*hasA*, *ideS*, *speH*, *scpA*, *prtS* et *scl*) (Malke *et al.*, 2006b). Parmi ceux-ci, *scpA* (codant la peptidase C5a homologue à la protéase PrtS de *St. thermophilus*) et *scl* sont connus comme des cibles de l'activateur Mga (McIver et Scott, 1997; McLandsborough et Cleary, 1995; Rasmussen *et al.*, 2000). De même, les autres facteurs de virulence notamment PrtS (protéase de surface ayant un pourcentage d'identité de 32% avec celle de *St. thermophilus*) sont soumis à une forte régulation positive et ne font pas partie du régulon Mga. Ce résultat suggère que CodY pourrait activer d'une manière directe l'expression de certains gènes dont ceux codant pour certains facteurs de virulence (Malke *et al.*, 2006b).

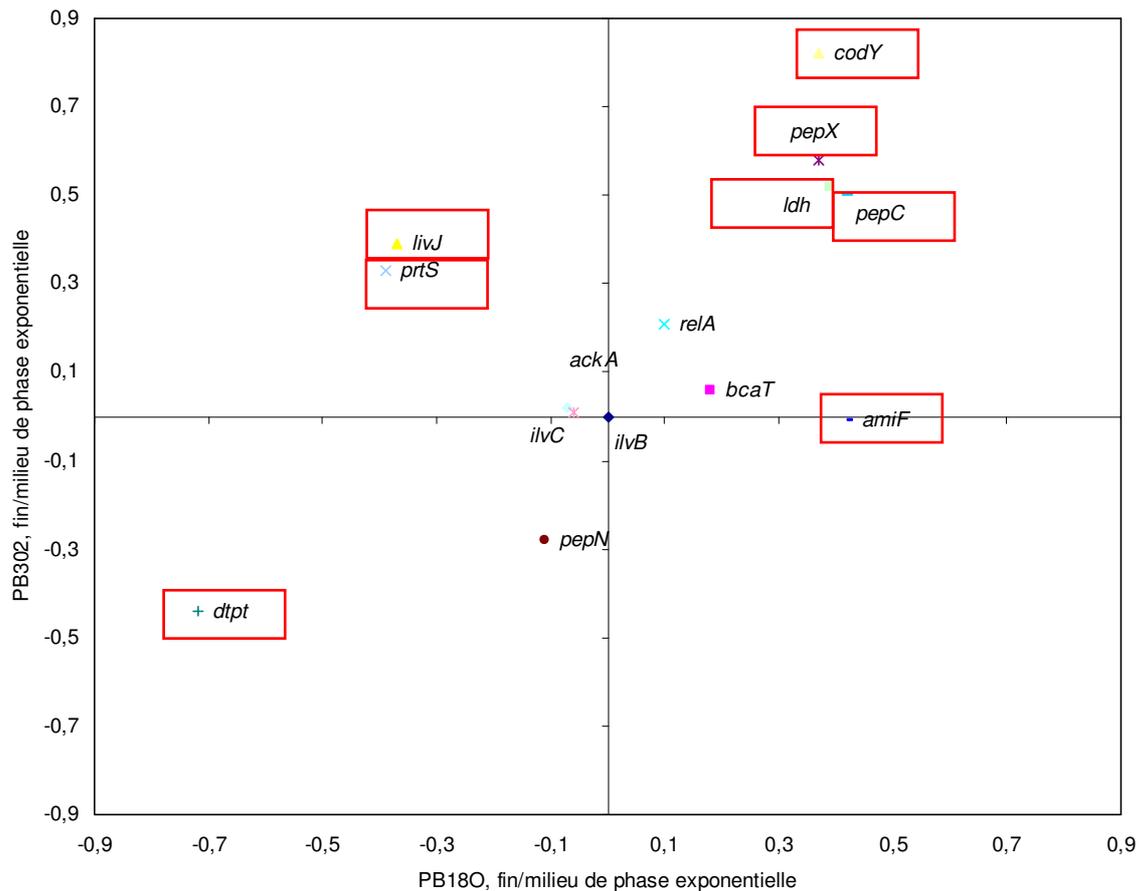
L'affinité de CodY pour les promoteurs des gènes qu'il régule et le nombre de molécules qui se fixent sont variables. Chez *Lc. lactis*, des expériences *in vitro* ont montré que plusieurs molécules de CodY se fixent sur le promoteur de l'opéron *opp* et le nombre de ces molécules est affecté par la quantité d'acides aminés branchés qui stimulent cet accrochage (den Hengst *et al.*, 2005a). Chez *St. pneumoniae*, l'affinité de CodY pour son propre promoteur est relativement faible en présence de faible concentration de BCAA, alors que l'affinité globale de CodY pour la région promotrice du gène *gdhA* (qui code pour la glutamate déshydrogénase) est beaucoup plus élevée, ce qui indique que, même à de très faibles concentrations de BCAA, CodY pourrait encore réprimer l'expression du gène *gdhA* et ne pas réprimer sa propre expression (Hendriksen *et al.*, 2008). Chez *B. subtilis*, CodY est plus exprimée durant la phase exponentielle de croissance que durant la phase stationnaire et la régulation par CodY pourrait être modulée par la concentration de la protéine CodY elle-même (Slack *et al.*, 1995).

Chez *St. thermophilus*, la comparaison du taux d'expression des gènes sélectionnés chez la souche PB302 cultivée en lait ou en milieu M17 pour les deux temps de croissance testés dans ces deux milieux (Figure 22), suggère une surexpression du gène *codY* ainsi que

des gènes intervenant dans la synthèse (*bcaT*, *ilvB*, *ilvC*) ou le transport des BCAA (opéron *liv*), des gènes intervenant dans la genèse des peptides à partir des protéines du milieu (*priS*) ou dans le transport des peptides (opéron *ami* et gène *dtpt*) et du gène *ackA*. Tous ces gènes, sauf le gène *dtpt* ont une boîte CodY (Tableau 22). Sur la base de ce qui est rapporté dans la littérature, la surexpression des gènes *bcaT*, *ilvB*, *ilvC* et de l'opéron *liv*, devrait permettre à la concentration intracellulaire des BCAA d'augmenter et, par conséquent, à la protéine codY d'être active (den Hengst *et al.*, 2006). Elle pourrait donc jouer son rôle de régulateur. S'il s'agit d'un répresseur comme dans le cas de *Lc. lactis*, elle devrait alors réprimer les gènes qu'elle régule pour finir par éteindre son propre gène. Cela devrait donc aboutir à la répression des gènes cités précédemment, dont le gène *priS*. Dans la mesure où nous ne disposons que de deux points en milieu lait, nous ne pouvons conclure quant à la validité de ce scénario. Néanmoins, il ne rend pas compte de la situation observée pour la souche PB302 cultivée en milieu M17. Ce milieu étant un milieu riche en acides aminés libres et peptides, la quantité de BCAA n'est pas limitante et leur quantité intracellulaire devrait rapidement être suffisante pour permettre à CodY de jouer son rôle de répresseur et finir par réprimer son propre gène. Or, il semble qu'à la fin de la phase exponentielle/début de phase stationnaire, une augmentation de la transcription du gène *codY*, comme des gènes *pepC*, *pepX*, *priS* et de l'opéron *liv* (Figure 25).

Chez la souche PB180, le gène *codY* semble être exprimé au même taux dans les deux milieux lait et M17, et ce, pour les deux temps de croissance testés (Figure 21). Les gènes *ilvB*, *ilvC*, *pepC* et l'opéron *liv* semblent surexprimés en début de croissance en lait et le gène *ackA* réprimé. Si CodY est un répresseur, alors la surexpression des gènes *ilvB*, *ilvC* et de l'opéron *liv* pourrait permettre à la bactérie d'être approvisionnée en BCAA, ce qui devrait aboutir à l'activation de CodY et à la répression des gènes qu'ils régulent, dont le gène *priS*. N'ayant pas de point supplémentaire dans ce milieu, il est difficile de savoir si le gène *priS* pourrait être induit ensuite, c'est-à-dire, à l'entrée en phase stationnaire afin de permettre un regain de croissance. Cependant, la croissance de la souche PB180 n'est pas une croissance diauxique, donc, il n'y a pas de regain de croissance. Au contraire, la souche PB180 se développe mal en milieu lait. En outre, en milieu M17 où les BCAA ne sont pas en quantité limitante, l'expression du gène *codY* semble augmenter à la fin de la phase exponentielle de croissance/début de phase stationnaire, même si elle reste inférieure à celle observée chez la souche PB302 (Figure 25).

Ainsi, les données que nous avons recueillies suggèrent une situation plus complexe pour ce qui concerne le régulon CodY. *St. thermophilus* étant un Streptocoque, il est possible



**Figure 25 :  $\text{Log}_{10}$  du rapport d'expression de chacun des gènes d'intérêt déterminé en fin de phase exponentielle (début de phase stationnaire) et en milieu de phase exponentielle (fin/milieu) chez les souches PB180 et PB302 cultivées en milieu M17**

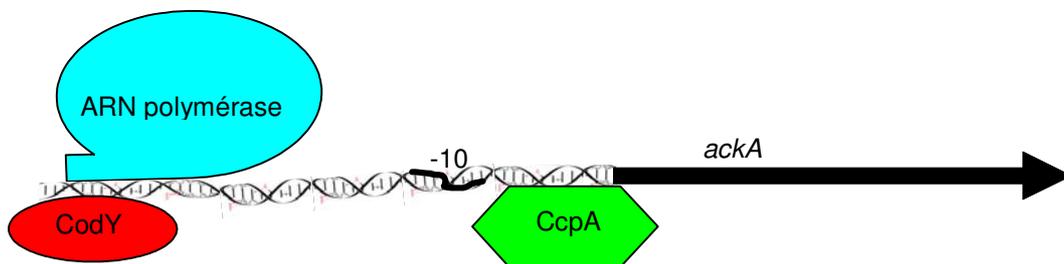
Les valeurs positives indiquent une augmentation de l'expression du gène considéré en fin de phase exponentielle par rapport au milieu de cette phase et les valeurs négatives indiquent une diminution de l'expression de ce gène. Chaque taux est la moyenne de deux expériences indépendantes. Une augmentation d'un facteur 2 correspond à une valeur de 0,3 ( $\text{Log}_{10} 2 = 0,3$ ) et une diminution d'un facteur 2 correspond à une valeur de -0,3 ( $\text{Log}_{10} 0,5 = -0,3$ ).

que le régulateur CodY ait le même fonctionnement que chez d'autres streptocoques, à savoir un rôle de répresseur ou d'activateur selon les gènes, et peut-être selon le milieu et/ou la phase de croissance, cela étant lié à la concentration intracellulaire de BCAA. Il faut d'ailleurs noter que chez la bactérie Gram<sup>+</sup> *B. subtilis*, il a été démontré comme activateur et répresseur également. En effet, chez *B. subtilis*, la protéine CodY est capable d'activer la transcription du gène *bsrF* en se fixant à -329 pb du site d'initiation de la transcription (Preis *et al.*, 2009). En outre, il se pourrait qu'il soit activateur également chez *Lc. lactis*, mais que les gènes régulés positivement n'aient pas été identifiés à ce jour. Revoyons à la lumière de cette nouvelle hypothèse le taux d'expression des différents gènes chez la souche PB302 cultivée en milieu lait. Lors de la croissance de la souche PB302, présentant une croissance importante, en milieu lait, l'expression des gènes intervenant dans la synthèse (*bcaT*, *ilvB* et *ilvC*) ou le transport des BCAA (opéron *liv*) aboutit à une augmentation de la concentration intracellulaire de BCAA et à l'activation du régulateur CodY. Celui-ci pourrait alors réguler positivement certains gènes dont les gènes *ackA*, *prtS* et peut-être *codY* lui-même. Tous ces gènes ne sont pas activés avec la même efficacité car l'affinité de CodY varie suivant les promoteurs et la concentration intracellulaire en BCAA. Donc, la potentielle activation de ces gènes par le régulateur CodY chez la souche PB302 en lait pourrait s'expliquer par une surexpression du gène *codY* accompagnée d'une bonne concentration des potentiels cofacteurs en lait. En milieu M17, l'augmentation de l'expression du gène *codY* en fin de phase exponentielle/début de phase stationnaire permettrait l'augmentation de la transcription des gènes qu'il régule, tels que les gènes *pepC*, *pepX*, *livJ* ou *prtS*. Pour ce dernier une situation paradoxale persiste. En effet, en fin de phase exponentielle, la transcription de ce gène augmente alors que l'activité protéolytique s'effondre. Les hypothèses évoquées précédemment peuvent rendre compte de cette situation.

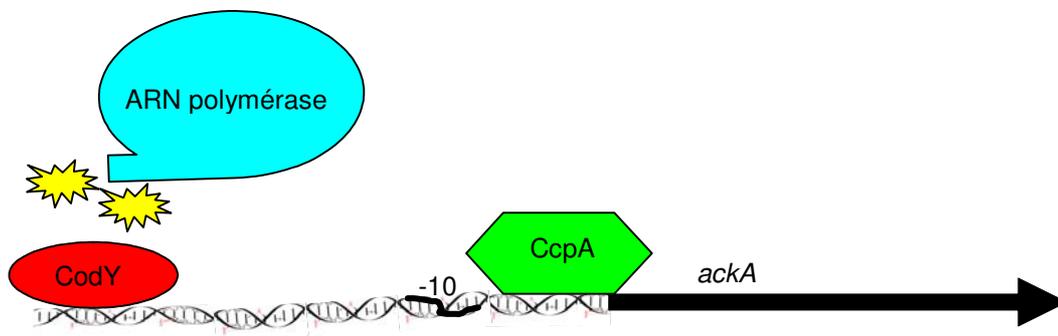
Dans le cas de la souche PB180, présentant une croissance intermédiaire en lait, CodY ne peut jouer pleinement son rôle d'activateur car la concentration intracellulaire en BCAA est peut-être insuffisante pour activer CodY dont l'expression n'est pas induite. Un certain nombre de gènes nécessaires à la croissance de *St. thermophilus* en lait ne sont alors pas exprimés suffisamment pour permettre à la souche de se développer à forte concentration cellulaire. En milieu M17, si l'augmentation du taux de transcription du gène *codY* est observée à la fin de la phase exponentielle/début de phase stationnaire, elle pourrait ne pas être suffisante pour que CodY active efficacement des gènes qu'il régule, tel que le gène *prtS*. Même si nous n'avons envisagé dans cette hypothèse que le rôle activateur de CodY, il n'est

pas exclu que ce régulateur puisse réprimer certains gènes chez *St. thermophilus*. Enfin, la surexpression du gène *codY* en lait chez la souche PB302 et ne pas chez la souche PB180 pourrait résulter soit d'une autorégulation positive grâce à la bonne concentration des BCAA chez la souche PB302 en lait, soit d'une intervention d'un deuxième régulateur central avec un effet positif et/ou négatif chez les deux souches PB302 et PB180 respectivement.

A



B



**Figure 26 : Représentation schématique de la potentielle régulation génétique du gène *ackA* de *St. thermophilus* PB302 et PB180**

La potentielle position des deux régulateurs CodY et CcpA d'une part et l'ARN polymérase de l'autre part qui engendrerait : une potentielle régulation positive (A) ou une potentielle régulation négative (B). La phase codante du gène *ackA* n'est pas représentée à l'échelle. Le motif -10 correspond à la potentielle boîte -10 étendue du promoteur.

La régulation par CodY de ces gènes n'exclut pas l'intervention d'autres régulateurs comme cela pourrait être le cas pour le gène *ackA*. Dans la région promotrice du gène *ackA* des deux souches étudiées PB180 et PB302, deux boîtes potentielles de deux régulateurs transcriptionnels (CodY et CcpA) ont été identifiées avec des positions relatives au codant start à -66 pour la boîte CodY et à -12 pour le site *cre* (Figure 17). Si le gène *ackA* est régulé par les deux régulateurs CodY et CcpA, cette régulation serait plutôt négative car les régions potentielles de la fixation des deux protéines recouvrent la boîte -10 empêchant l'initiation de la transcription de ce gène (Figure 26-B). Néanmoins, cette régulation pourrait être positive dans le cas où les deux régulateurs CodY et CcpA d'une part et l'ARN polymérase d'autre part se lieraient à l'hélice d'ADN face à face surtout que les deux régions affines aux protéines CodY et CcpA sont séparées de 55 pb, suggérant que les molécules CodY et CcpA seraient sur la même face de l'hélice d'ADN lorsqu'elles y sont liées (Figure 26-A).

Chez la souche PB302 nous avons observé que l'expression du gène *ackA* est induite en lait au début et au milieu de la phase exponentielle de croissance (Figure 22). Cette induction semble être simultanée avec la surexpression du gène *codY* (Figure 22). Chez la souche PB180, l'expression du gène *codY* est similaire entre les deux milieux pour les deux phases étudiées (début et milieu de phase exponentielle) alors que l'expression du gène *ackA* est similaire au milieu de la phase exponentielle et réprimée au début de la phase exponentielle en lait (Figure 21). Sachant que les deux milieux lait et M17 possèdent la même source carbonée (le lactose), le rôle du régulateur CcpA semble être minimisé. Par contre, la potentielle activation de ce gène par le régulateur CodY chez la souche PB302 en lait pourrait s'expliquer par une surexpression du gène *codY* accompagnée d'une bonne concentration des potentiels co-facteurs. La répression du gène *ackA* remarquée au début de la phase exponentielle en lait par rapport au milieu M17 chez la souche PB180 pourrait être expliquée par un manque de co-facteurs potentiels nécessaires pour l'activation de CodY.

Pour conclure, la situation que nous avons observée suggère que la régulation du gène *prtS* et du métabolisme azoté chez *St. thermophilus* est complexe. Le fait que deux souches possèdent les mêmes gènes ne suffit pas à leur expression et bien que le gène *prtS* ait été acquis par transfert horizontal chez les deux souches PB180 et PB302, le schéma de régulation dans lequel il s'est inséré a déterminé son potentiel d'expression.

Des résultats récents obtenus au laboratoire ont montré que des souches possédant le même allèle *prtS* ne génèrent pas forcément les mêmes peptides, dont des peptides bioactifs, à

partir des caséines  $\beta$ ,  $\alpha_{S1}$  et  $\alpha_{S2}$  (Miclo *et al.*, sous presse). L'hypothèse formulée est que cette variabilité proviendrait d'une expression différente du gène *prtS*, faisant ainsi varier le rapport Enzyme/Substrat. Si cette hypothèse est avérée, alors l'élucidation de la régulation du gène *prtS*, mais aussi de la maturation de la protéase est capitale. Enfin, comprendre la régulation du métabolisme azoté chez cette bactérie demeure important pour la maîtrise de son développement lors de la fabrication de produits laitiers fermentés.

## **V. Perspectives**

## Perspectives :

Les principales perspectives ouvertes par ce travail concernent d'une part l'étude de la sécrétion et de la maturation de la protéase PrtS et d'autre part, la régulation de ce gène et plus largement des gènes impliqués dans le système protéolytique de surface de *St. thermophilus*.

Pour ce qui concerne la maturation de PrtS, quatre PPIases putatives ont été identifiées dans le génome des souches LMG18311, CNRZ1066 et LMD-9. Deux d'entre-elles sont homologues de PPIases intervenant dans la sécrétion/maturation de protéases de surface de *St. pyogenes* et *Lc. lactis*. Ainsi, pour étudier la régulation et la maturation de PrtS, notre approche consistera à interrompre les gènes soupçonnés d'intervenir dans chacun de ces deux processus puis d'étudier dans un contexte mutant l'expression et la maturation de la protéase PrtS. Cette approche sera complétée par la fabrication d'une banque de mutants insertionnels et son criblage sur l'activité PrtS.

Les résultats obtenus au cours de ce travail suggèrent un contrôle direct ou indirect de l'expression de gène *prtS* par le régulateur transcriptionnel CodY. Nous avons émis l'hypothèse que CodY pourrait activer l'expression de certains gènes dont le gène *prtS*. La vérification de cette hypothèse passe par l'inactivation du gène *codY*. L'analyse de l'expression des gènes (puces à ADN) dans le contexte mutant ou sauvage en présence/absence d'acides aminés ramifiés permettra de déterminer le nombre de gènes régulés par CodY et de voir si la régulation est positive ou négative. De plus, des expériences de retardement sur gel pourraient nous donner des indices sur la liaison de la protéine CodY dans les régions promotrices de certains gènes. L'affinité de CodY pour les promoteurs des gènes qu'il régule pourrait être déterminée en fonction de la concentration des potentiels co-facteurs (acides aminés ramifiés et/ou GTP).

Finalement, l'inactivation des gènes *codY* et *ccpA* (simple et double mutants) suivi d'une analyse transcriptomique globale serait d'une grande importance pour déterminer quels sont les gènes régulés via une coordination entre ces deux régulateurs chez *St. thermophilus*.

## **Apport technologique :**

Nous avons choisi d'étudier l'expression de certains gènes identifiés dans les précédentes études comme des facteurs clés pour la croissance de *St. thermophilus* en lait, un caractère important pour les industriels. L'étude au niveau protéomique pour lequel nous n'avons pas de données, permettrait d'une part de valider les résultats obtenus dans ce travail et d'autre part, de mieux connaître l'adaptation de cette bactérie dans le lait. Ainsi, une meilleure compréhension de la physiologie de *St. thermophilus* permettrait d'améliorer certains procédés de fabrications laitières dont la production de peptides à activité biologique. La variabilité au niveau de la régulation du gène *pvtS*, mais aussi de la maturation de la protéase pourrait faire varier le rapport Enzyme/Substrat dans le procédé de la production des peptides à activité biologique. Ainsi, l'éclaircissement de ces mécanismes pourrait être capital dans le procédé de la fabrication de produits laitiers fonctionnels.



## **VI. Références Bibliographiques**

## VI. Références Bibliographiques :

- Alloing, G., Granadel, C., Morrison, D.A., Claverys, J.P., 1996. Competence pheromone, oligopeptide permease, and induction of competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 21(3), 471-478.
- Alloing, G., de Philip, P., 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(1), 44-58.
- Anastasiou, R., Papadelli, M., Georgalaki, M.D., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., 2002. Cloning and sequencing of the gene encoding X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase (PepX) from *Streptococcus thermophilus* strain ACA-DC 4. *J. Appl. Microbiol.* 93(1), 52-59.
- l' Anson, K.J., Movahedi, S., Griffin, H.G., Gasson, M.J., Mulholland, F., 1995. A non-essential glutamyl aminopeptidase is required for optimal growth of *Lactococcus lactis* MG1363 in milk. *Microbiology (Reading, Engl.)*. 141 ( Pt 11), 2873-2881.
- Arena, S., D'Ambrosio, C., Renzone, G., Rullo, R., Ledda, L., Vitale, F., Maglione, G., Varcamonti, M., Ferrara, L., Scaloni, A., 2006. A study of *Streptococcus thermophilus* proteome by integrated analytical procedures and differential expression investigations. *Proteomics.* 6(1), 181-192.
- Arioli, S., Monnet, C., Guglielmetti, S., Parini, C., De Noni, I., Hogenboom, J., Halami, P., Mora, D., 2007. Aspartate Biosynthesis is Essential for the Growth of *Streptococcus thermophilus* in Milk and its Availability Modulates the Level of Urease Activity. *Appl. Environ. Microbiol.* AEM.00533-07.
- Asanuma, N., Hino, T., 2000. Effects of pH and Energy Supply on Activity and Amount of Pyruvate Formate-Lyase in *Streptococcus bovis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(9), 3773-3777.
- Asanuma, N., Yoshii, T., Hino, T., 2004. Molecular Characterization of CcpA and Involvement of This Protein in Transcriptional Regulation of Lactate Dehydrogenase and Pyruvate Formate-Lyase in the Ruminal Bacterium *Streptococcus bovis*. *Appl Environ Microbiol.* 70(9), 5244-5251.
- Belitsky, B.R., Gustafsson, M.C., Sonenshein, A.L., Von Wachenfeldt, C., 1997. An lrp-like gene of *Bacillus subtilis* involved in branched-chain amino acid transport. *J Bacteriol.* 179(17), 5448-5457.
- Belitsky, B.R., Sonenshein, A.L., 2008. Genetic and Biochemical Analysis of CodY-Binding Sites in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 190(4), 1224-1236.
- Bellanger, X., Roberts, A.P., Morel, C., Choulet, F., Pavlovic, G., Mullany, P., Decaris, B., Guedon, G., 2009. Conjugative Transfer of the Integrative Conjugative Elements ICeSt1 and ICeSt3 from *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.* 191(8), 2764-2775.
- Beloin, C., Ayora, S., Exley, R., Hirschbein, L., Ogasawara, N., Kasahara, Y., Alonso, J.C., Hégarat, F.L., 1997. Characterization of an lrp-like (IrpC) gene from *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 256(1), 63-71.
- Beloin, C., Exley, R., Mahé, A.-L., Zouine, M., Cubasch, S., Le Hégarat, F., 2000. Characterization of LrpC DNA-Binding Properties and Regulation of *Bacillus subtilis* lrpC Gene Expression. *J Bacteriol.* 182(16), 4414-4424.
- Blomqvist, T., Steinmoen, H., Havarstein, L.S., 2006. Natural Genetic Transformation: a Novel Tool for Efficient Genetic Engineering of the Dairy Bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(10), 6751-6756.

- Boekhorst, J., de Been, M.W.H.J., Kleerebezem, M., Siezen, R.J., 2005. Genome-Wide Detection and Analysis of Cell Wall-Bound Proteins with LPxTG-Like Sorting Motifs. *J Bacteriol.* 187(14), 4928-4934.
- Van den Bogaard, P.T.C., Hols, P., Kuipers, O.P., Kleerebezem, M., de Vos, W.M., 2004. Sugar utilisation and conservation of the gal-lac gene cluster in *Streptococcus thermophilus*. *System.* 27, 10–17.
- Van den Bogaard, P.T.C., Crispie, F., Hols, P., Kuipers, O.P., Kleerebezem, M., de Vos, W.M., 2002. Modulation of glycolysis by lactose availability in *Streptococcus thermophilus*. In: *Catabolite control of sugar metabolism in Streptococcus thermophilus*. Wageningen University.
- Van den Bogaard, P.T.C., Kleerebezem, M., Kuipers, O.P., de Vos, W.M., 2000. Control of Lactose Transport, beta -Galactosidase Activity, and Glycolysis by CcpA in *Streptococcus thermophilus*: Evidence for Carbon Catabolite Repression by a Non-Phosphoenolpyruvate-Dependent Phosphotransferase System Sugar. *J. Bacteriol.* 182(21), 5982-5989.
- 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., Burteau, S., Boutry, M., Delcour, J., Goffeau, A., Hols, P., 2004. Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nat. Biotechnol.* 22(12), 1554-1558.
- Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarne, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D., Sorokin, A., 2001. The Complete Genome Sequence of the Lactic Acid Bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Research.* 11(5), 731 -753.
- Bonifait, L., de la Cruz Dominguez-Punaro, M., Vaillancourt, K., Bart, C., Slater, J., Frenette, M., Gottschalk, M., Grenier, D., 2010. The cell envelope subtilisin-like proteinase is a virulence determinant for *Streptococcus suis*. *BMC Microbiol.* 10(1), 42.
- Borezee, E., Msadek, T., Durant, L., Berche, P., 2000. Identification in *Listeria monocytogenes* of MecA, a Homologue of the *Bacillus subtilis* Competence Regulatory Protein. *J. Bacteriol.* 182(20), 5931-5934.
- Borezée-Durant, E., Hiron, A., Piard, J.-C., Juillard, V., 2009. Dual Role of the Oligopeptide Permease Opp3 during Growth of *Staphylococcus aureus* in Milk. *Appl Environ Microbiol.* 75(10), 3355-3357.
- Bourgoin, F., Guédon, G., Pébay, M., Roussel, Y., Panis, C., Decaris, B., 1996. Characterization of a mosaic ISS1 element and evidence for the recent horizontal transfer of two different types of ISS1 between *Streptococcus thermophilus* and *Lactococcus lactis*. *Gene.* 178(1-2), 15-23.
- Bracquart, P., Lorient, D., 1979. Effet des acides aminés et peptides sur la croissance de *Streptococcus thermophilus*. III Peptides comportant Glu, His et Met. *Milchwissenschaft.* 676–679.
- Bracquart, P., Lorient, D., 1977. Effet des acides aminés sur la croissance de *Streptococcus thermophilus*.
- Brinkman, A.B., Ettema, T.J.G., de Vos, W.M., van der Oost, J., 2003. The Lrp family of transcriptional regulators. *Mol. Microbiol.* 48(2), 287-294.
- Broadbent, J.R., McMahon, D.J., Welker, D.L., Oberg, C.J., Moineau, S., 2003. Biochemistry, Genetics, and Applications of Exopolysaccharide Production in *Streptococcus thermophilus*: A Review. *J. Dairy Sci.* 86(2), 407-423.
- Brochet, M., Couvé, E., Zouine, M., Vallaëys, T., Rusniok, C., Lamy, M.-C., Buchrieser, C., Trieu-Cuot, P., Kunst, F., Poyart, C., Glaser, P., 2006. Genomic diversity and evolution within the species *Streptococcus agalactiae*. *Microbes and Infection.* 8(5),

- 1227-1243.
- Calvo, J.M., Matthews, R.G., 1994. The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 58(3), 466-490.
- Carter, T.H., Miller, C.G., 1984. Aspartate-specific peptidases in *Salmonella typhimurium*: mutants deficient in peptidase E. *J Bacteriol.* 159(2), 453-459.
- Chapot-Chartier, M.P., Rul, F., Nardi, M., 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(2), 497-506.
- Chaussee, M.S., Somerville, G.A., Reitzer, L., Musser, J.M., 2003. Rgg Coordinates Virulence Factor Synthesis and Metabolism in *Streptococcus pyogenes*. *J. Bacteriol.* 185(20), 6016-6024.
- Chaussee, M.A., Callegari, E.A., Chaussee, M.S., 2004. Rgg Regulates Growth Phase-Dependent Expression of Proteins Associated with Secondary Metabolism and Stress in *Streptococcus pyogenes*. *J Bacteriol.* 186(21), 7091-7099.
- Chavagnat, F., Meyer, J., Casey, M.G., 2000. Purification, characterisation, cloning and sequencing of the gene encoding oligopeptidase PepO from *Streptococcus thermophilus* A. *FEMS microbiology letters.* 191(1), 79-85.
- Chavagnat, F., Casey, M.G., Meyer, J., 1999. Purification, Characterization, Gene Cloning, Sequencing, and Overexpression of Aminopeptidase N from *Streptococcus thermophilus* A. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(7), 3001-3007.
- Chen, C.F., Lan, J., Korovine, M., Shao, Z.Q., Tao, L., Zhang, J., Newman, E.B., 1997. Metabolic regulation of Irp gene expression in *Escherichia coli* K-12. *Microbiology.* 143(6), 2079-2084.
- Chen, S., Rosner, M.H., Calvo, J.M., 2001. Leucine-regulated self-association of leucine-responsive regulatory protein (Lrp) from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 312(4), 625-635.
- Chen, S., Calvo, J.M., 2002. Leucine-induced dissociation of *Escherichia coli* Lrp hexadecamers to octamers. *J. Mol. Biol.* 318(4), 1031-1042.
- Cho, B.-K., Barrett, C.L., Knight, E.M., Park, Y.S., Palsson, B.Ø., 2008. Genome-scale reconstruction of the Lrp regulatory network in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105(49), 19462-19467.
- Chomczynski, P., 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques.* 15(3), 532-534, 536-537.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162(1), 156-159.
- Chopard, M.-A., Schmitt, M., Perreard, E., Chamba, J.-F., 2001. Aspect qualitatif de l'activité protéolytique des lactobacilles thermophiles utilisés en fabrication de fromages à pâte pressée cuite = Qualitative aspect of proteolytic activity of thermophilic lactobacilli using in Swiss cheeses.
- Christensen, J.E., Dudley, E.G., Pederson, J.A., Steele, J.L., 1999. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 76(1-4), 217-246.
- Christensen, J.E., Lin, D.-I., Palva, A., Steele, J.L., 1995. Sequence analysis, distribution and expression of an aminopeptidase N-encoding gene from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 [Gene 155 (1995) 89-93]. *Gene.* 164(1), 189-190.
- Claverys, J.P., Prudhomme, M., Mortier-Barrière, I., Martin, B., 2000. Adaptation to the environment: *Streptococcus pneumoniae*, a paradigm for recombination-mediated genetic plasticity? *Mol. Microbiol.* 35(2), 251-259.
- Collins, M.D., Samelis, J., Metaxopoulos, J., Wallbanks, S., 1993. Taxonomic studies on

- some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacteriol.* 75(6), 595-603.
- Collins, M.D., Rodrigues, U., Ash, C., Aguirre, M., Farrow, J.A.E., Martinez-Murcia, A., Phillips, B.A., Williams, A.M., Wallbanks, S., 1991. Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiology Letters.* 77(1), 5-12.
- Comfort, D., Clubb, R.T., 2004. A Comparative Genome Analysis Identifies Distinct Sorting Pathways in Gram-Positive Bacteria. *Infect. Immun.* 72(5), 2710-2722.
- Courtin, P., Monnet, V., Rul, F., 2002. Cell-wall proteinases PrtS and PrtB have a different role in *Streptococcus thermophilus*/*Lactobacillus bulgaricus* mixed cultures in milk. *Microbiology (Reading, Engl.)*. 148(Pt 11), 3413-3421.
- Cron, L.E., Bootsma, H.J., Noske, N., Burghout, P., Hammerschmidt, S., Hermans, P.W.M., 2009. Surface-associated lipoprotein PpmA of *Streptococcus pneumoniae* is involved in colonization in a strain-specific manner. *Microbiology.* 155(7), 2401-2410.
- Cui, Y., Wang, Q., Stormo, G.D., Calvo, J.M., 1995. A consensus sequence for binding of Lrp to DNA. *J. Bacteriol.* 177(17), 4872-4880.
- Cundell, D.R., Gerard, N.P., Gerard, C., Idanpaan-Heikkila, I., Tuomanen, E.I., 1995. *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature.* 377(6548), 435-438.
- Cunningham, M.W., 2000. Pathogenesis of Group A Streptococcal Infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 13(3), 470-511.
- Dartois, V., Liu, J., Hoch, J.A., 1997. Alterations in the flow of one-carbon units affect KinB-dependent sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 25(1), 39-51.
- Dauner, M., Storni, T., Sauer, U., 2001. *Bacillus subtilis* Metabolism and Energetics in Carbon-Limited and Excess-Carbon Chemostat Culture. *J. Bacteriol.* 183(24), 7308-7317.
- Deguchi, Y., Morishita, T., 1992. Nutritional Requirements in Multiple Auxotrophic Lactic Acid Bacteria: Genetic Lesions Affecting Amino Acid Biosynthetic Pathways in *Lactococcus Lactis*, *Enterococcus faecium*, and *Pediococcus acidilactici*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry.* 56(6), 913-918.
- Delorme, C., Bartholini, C., Bolotine, A., Ehrlich, S.D., Renault, P., 2010. Emergence of a cell wall protease in the *Streptococcus thermophilus* population. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(2), 451-460.
- Delorme, C., Poyart, C., Ehrlich, S.D., Renault, P., 2006. Extent of Horizontal Gene Transfer in Evolution of Streptococci of the *Salivarius* Group. *J. Bacteriol.* JB.01058-06.
- Derzelle, S., Bolotin, A., Mistou, M.-Y., Rul, F., 2005. Proteome analysis of *Streptococcus thermophilus* grown in milk reveals pyruvate formate-lyase as the major upregulated protein. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(12), 8597-8605.
- Desmazeaud, M., 1983. L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques Current state of research on lactic acid bacteria nutrition. *Le Lait.* 63(629-630), 50.
- Detmers, F.J., Kunji, E.R., Lanfermeijer, F.C., Poolman, B., Konings, W.N., 1998. Kinetics and specificity of peptide uptake by the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. *Biochemistry.* 37(47), 16671-16679.
- Detmers, F.J., Lanfermeijer, F.C., Abele, R., Jack, R.W., Tampe, R., Konings, W.N., Poolman, B., 2000. Combinatorial peptide libraries reveal the ligand-binding mechanism of the oligopeptide receptor OppA of *Lactococcus lactis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97(23), 12487-12492.
- Deveau, H., Barrangou, R., Garneau, J.E., Labonte, J., Fremaux, C., Boyaval, P., Romero,

- D.A., Horvath, P., Moineau, S., 2008. Phage Response to CRISPR-Encoded Resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.* 190(4), 1390-1400.
- Dramsi, S., Trieu-Cuot, P., Bierne, H., 2005. Sorting sortases: a nomenclature proposal for the various sortases of Gram-positive bacteria. *Research in Microbiology.* 156(3), 289-297.
- Driessen, A.J.M., Hellingwerf, K.J., Konings, W.N., 1987. Mechanism of energy coupling to entry and exit of neutral and branched chain amino acids in membrane vesicles of *Streptococcus cremoris*. *J. Biol. Chem.* 12438-12443.
- Drouault, S., Anba, J., Bonneau, S., Bolotin, A., Ehrlich, S.D., Renault, P., 2002. The Peptidyl-Prolyl Isomerase Motif Is Lacking in PmpA, the PrsA-Like Protein Involved in the Secretion Machinery of *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(8), 3932-3942.
- Drouault, S., Corthier, G., Ehrlich, S.D., Renault, P., 2000. Expression of the *Staphylococcus hyicus* Lipase in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(2), 588-598.
- Ercolini, D., Fusco, V., Blaiotta, G., Coppola, S., 2005. Sequence heterogeneity in the lacSZ operon of *Streptococcus thermophilus* and its use in PCR systems for strain differentiation. *Res. Microbiol.* 156(2), 161-172.
- Ernsting, B.R., Atkinson, M.R., Ninfa, A.J., Matthews, R.G., 1992. Characterization of the regulon controlled by the leucine-responsive regulatory protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 174(4), 1109-1118.
- Exterkate, F.A., de Veer, G.J.C.M., 1985. Partial Isolation and Degradation of Caseins by Cell Wall Proteinase(s) of *Streptococcus cremoris* HP. *Appl. Environ. Microbiol.* 49(2), 328-332.
- Fang, G., Konings, W.N., Poolman, B., 2000. Kinetics and Substrate Specificity of Membrane-Reconstituted Peptide Transporter DtpT of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 182(9), 2530-2535.
- Fernandez, A., Borges, F., Gintz, B., Decaris, B., Leblond-Bourget, N., 2006. The rggC locus, with a frameshift mutation, is involved in oxidative stress response by *Streptococcus thermophilus*. *Arch Microbiol.* 186(3), 161-169.
- Fernandez, L., Bhowmik, T., Steele, J.L., 1994. Characterization of the *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 pepC gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(1), 333-336.
- Fernandez-Esplá, M.D., Rul, F., 1999. PepS from *Streptococcus thermophilus*. A new member of the aminopeptidase T family of thermophilic bacteria. *Eur. J. Biochem.* 263(2), 502-510.
- Fernandez-Esplá, M.D., Garault, P., Monnet, V., Rul, F., 2000. *Streptococcus thermophilus* Cell Wall-Anchored Proteinase: Release, Purification, and Biochemical and Genetic Characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(11), 4772-4778.
- Ferrario, M., Ernsting, B.R., Borst, D.W., Wiese, D.E., Blumenthal, R.M., Matthews, R.G., 1995. The leucine-responsive regulatory protein of *Escherichia coli* negatively regulates transcription of ompC and micF and positively regulates translation of ompF. *J. Bacteriol.* 177(1), 103-113.
- Ferretti, J.J., McShan, W.M., Ajdic, D., Savic, D.J., Savic, G., Lyon, K., Primeaux, C., Sezate, S., Suvorov, A.N., Kenton, S., Lai, H.S., Lin, S.P., Qian, Y., Jia, H.G., Najjar, F.Z., Ren, Q., Zhu, H., Song, L., White, J., Yuan, X., Clifton, S.W., Roe, B.A., McLaughlin, R., 2001. Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 98(8), 4658-4663.
- Fink, P.S., 1993. Biosynthesis of the branched-chain amino acids. In *Bacillus subtilis and Other Gram-positive Bacteria*, DC: American Society for Microbiology Press., p. 307-317.

- Fisher, S.H., 1999. Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: vive la différence! *Mol. Microbiol.* 32(2), 223-232.
- Fontaine, L., Boutry, C., de Frahan, M.H., Delplace, B., Fremaux, C., Horvath, P., Boyaval, P., Hols, P., 2010. A Novel Pheromone Quorum-Sensing System Controls the Development of Natural Competence in *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*. *J Bacteriol.* 192(5), 1444-1454.
- Foucaud - Scheunemann, C., Poquet, I., 2003. HtrA is a key factor in the response to specific stress conditions in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiology Letters.* 224(1), 53-59.
- Gagnaire, V., Mollé, D., Herrouin, M., Léonil, J., 2001. Peptides identified during Emmental cheese ripening: origin and proteolytic systems involved. *J. Agric. Food Chem.* 49(9), 4402-4413.
- Galas, D.J., Chandler, M., 1989. Bacterial insertion sequences. *Mobile DNA.* 109-162.
- Galia, W., Perrin, C., Genay, M., Dary, A., 2009. Variability and molecular typing of *Streptococcus thermophilus* strains displaying different proteolytic and acidifying properties. *International Dairy Journal.* 19(2), 89-95.
- Garault, P., Letort, C., Juillard, V., Monnet, V., 2000. Branched-chain amino acid biosynthesis is essential for optimal growth of *Streptococcus thermophilus* in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(12), 5128-5133.
- Garault, P., Le Bars, D., Besset, C., Monnet, V., 2002. Three Oligopeptide-binding Proteins Are Involved in the Oligopeptide Transport of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Biological Chemistry.* 277(1), 32-39.
- Gardan, R., Besset, C., Guillot, A., Gitton, C., Monnet, V., 2009. The oligopeptide transport system is essential for the development of natural competence in *Streptococcus thermophilus* strain LMD-9. *J. Bacteriol.* 191(14), 4647-4655.
- Gazeau, M., Delort, F., Fromant, M., Dessen, P., Blanquet, S., Plateau, P., 1994. Structure-function relationship of the Lrp-binding region upstream of *lysU* in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 241(3), 378-389.
- Glaser, P., 2002. Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease. *Mol. Microbiol.* 45, 1499-1513.
- Godon, J.J., Chopin, M.C., Ehrlich, S.D., 1992. Branched-chain amino acid biosynthesis genes in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *J. Bacteriol.* 174(20), 6580-6589.
- Godon, J.J., Delorme, C., Bardowski, J., Chopin, M.C., Ehrlich, S.D., Renault, P., 1993. Gene inactivation in *Lactococcus lactis*: branched-chain amino acid biosynthesis. *J. Bacteriol.* 175(14), 4383-4390.
- Göthel, S.F., Schmid, R., Wipat, A., Carter, N.M., Emmerson, P.T., Harwood, C.R., Marahiel, M.A., 1997. An internal FK506-binding domain is the catalytic core of the prolyl isomerase activity associated with the *Bacillus subtilis* trigger factor. *Eur. J. Biochem.* 244(1), 59-65.
- Guédon, E., Serror, P., Ehrlich, S.D., Renault, P., Delorme, C., 2001a. Pleiotropic transcriptional repressor CodY senses the intracellular pool of branched-chain amino acids in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* 40(5), 1227-1239.
- Guédon, E., Renault, P., Ehrlich, S.D., Delorme, C., 2001b. Transcriptional Pattern of Genes Coding for the Proteolytic System of *Lactococcus lactis* and Evidence for Coordinated Regulation of Key Enzymes by Peptide Supply. *J. Bacteriol.* 183(12), 3614-3622.
- Guédon, E., Sperandio, B., Pons, N., Ehrlich, S.D., Renault, P., 2005. Overall control of nitrogen metabolism in *Lactococcus lactis* by CodY, and possible models for CodY regulation in Firmicutes. *Microbiology.* 151(12), 3895-3909.
- Guédon, G., Bourgoin, F., Pébay, M., Roussel, Y., Colmin, C., Simonet, J.M., Decaris, B., 1995. Characterization and distribution of two insertion sequences, *IS1191* and *iso-IS981*, in *Streptococcus thermophilus*: does intergeneric transfer of insertion

- sequences occur in lactic acid bacteria co-cultures? *Molecular Microbiology*. 16(1), 69-78.
- Guimont, C., Chopard, M.-A., Gaillard, J.-L., Chamba, J.-F., 2002. Comparative study of the protein composition of three strains of *Streptococcus thermophilus* grown either in M17 medium or in milk. *Le Lait*. 82(6), 12.
- Haandrikman, A.J., Kok, J., Laan, H., Soemitro, S., Ledebouer, A.M., Konings, W.N., Venema, G., 1989. Identification of a gene required for maturation of an extracellular lactococcal serine proteinase. *J. Bacteriol.* 171(5), 2789-2794.
- Haney, S.A., Platko, J.V., Oxender, D.L., Calvo, J.M., 1992. Lrp, a leucine-responsive protein, regulates branched-chain amino acid transport genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 174(1), 108-115.
- Harris, T.O., Shelver, D.W., Bohnsack, J.F., Rubens, C.E., 2003. A novel streptococcal surface protease promotes virulence, resistance to opsonophagocytosis, and cleavage of human fibrinogen. *J. Clin. Invest.* 111(1), 61-70.
- Hayacibara, M.F., Koo, H., Vacca Smith, A.M., Kopec, L.K., Scott-Anne, K., Cury, J.A., Bowen, W.H., 2004. The influence of mutanase and dextranase on the production and structure of glucans synthesized by streptococcal glucosyltransferases. *Carbohydrate Research*. 339(12), 2127-2137.
- Hebert, E.M., Raya, R.R., De Giori, G.S., 2000. Nutritional Requirements and Nitrogen-Dependent Regulation of Proteinase Activity of *Lactobacillus helveticus* CRL 1062. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(12), 5316-5321.
- Hendriksen, W.T., Bootsma, H.J., Estevao, S., Hoogenboezem, T., de Jong, A., de Groot, R., Kuipers, O.P., Hermans, P.W.M., 2008. CodY of *Streptococcus pneumoniae*: Link between Nutritional Gene Regulation and Colonization. *J. Bacteriol.* 190(2), 590-601.
- den Hengst, C.D., Curley, P., Larsen, R., Buist, G., Nauta, A., van Sinderen, D., Kuipers, O.P., Kok, J., 2005a. Probing Direct Interactions between CodY and the oppD Promoter of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 187(2), 512-521.
- den Hengst, C.D., Groeneveld, M., Kuipers, O.P., Kok, J., 2006. Identification and Functional Characterization of the *Lactococcus lactis* CodY-Regulated Branched-Chain Amino Acid Permease BcaP (Ctra). *J. Bacteriol.* 188(9), 3280-3289.
- den Hengst, C.D., van Hijum, S.A.F.T., Geurts, J.M.W., Nauta, A., Kok, J., Kuipers, O.P., 2005b. The *Lactococcus lactis* CodY Regulon: IDENTIFICATION OF A CONSERVED cis-REGULATORY ELEMENT. *Journal of Biological Chemistry*. 280(40), 34332-34342.
- Henkin, T.M., 1996. The role of the CcpA transcriptional regulator in carbon metabolism in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters*. 135(1), 9-15.
- Hermans, P.W.M., Adrian, P.V., Albert, C., Estevão, S., Hoogenboezem, T., Luijendijk, I.H.T., Kamphausen, T., Hammerschmidt, S., 2006. The Streptococcal Lipoprotein Rotamase A (SlrA) Is a Functional Peptidyl-prolyl Isomerase Involved in Pneumococcal Colonization. *Journal of Biological Chemistry*. 281(2), 968-976.
- Herve-Jimenez, L., Guillaouard, I., Guedon, E., Gautier, C., Boudebbouze, S., Hols, P., Monnet, V., Rul, F., Maguin, E., 2008. Physiology of *Streptococcus thermophilus* during the late stage of milk fermentation with special regard to sulfur amino-acid metabolism. *Proteomics*. 8(20), 4273-4286.
- Hesterkamp, T., Bukau, B., 1996. Identification of the prolyl isomerase domain of *Escherichia coli* trigger factor. *FEBS Lett.* 385(1-2), 67-71.
- Hesterkamp, T., Deuerling, E., Bukau, B., 1997. The amino-terminal 118 amino acids of *Escherichia coli* trigger factor constitute a domain that is necessary and sufficient for binding to ribosomes. *J. Biol. Chem.* 272(35), 21865-21871.
- 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., Kleerebezem, M., 2005. New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiol. Rev.* 29(3), 435-463.
- Holzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., Schillinger, U., 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(2 Suppl), 365S-373S.
- Horvath, P., Romero, D.A., Coute-Monvoisin, A.-C., Richards, M., Deveau, H., Moineau, S., Boyaval, P., Fremaux, C., Barrangou, R., 2008. Diversity, Activity, and Evolution of CRISPR Loci in *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.* 190(4), 1401-1412.
- Hoskins, J., Alborn, W.E., Arnold, J., Blaszcak, L.C., Burgett, S., DeHoff, B.S., Estrem, S.T., Fritz, L., Fu, D.-J., Fuller, W., Geringer, C., Gilmour, R., Glass, J.S., Khoja, H., Kraft, A.R., Lagace, R.E., LeBlanc, D.J., Lee, L.N., Lefkowitz, E.J., Lu, J., Matsushima, P., McAhren, S.M., McHenney, M., McLeaster, K., Mundy, C.W., Nicas, T.I., Norris, F.H., O’Gara, M., Peery, R.B., Robertson, G.T., Rockey, P., Sun, P.-M., Winkler, M.E., Yang, Y., Young-Bellido, M., Zhao, G., Zook, C.A., Baltz, R.H., Jaskunas, S.R., Rosteck, P.R., Skatrud, P.L., Glass, J.I., 2001. Genome of the Bacterium *Streptococcus pneumoniae* Strain R6. *J. Bacteriol.* 183(19), 5709-5717.
- Hu, Q., Liu, P., Yu, Z., Zhao, G., Li, J., Teng, L., Zhou, M., Bei, W., Chen, H., Jin, M., 2010. Identification of a cell wall-associated subtilisin-like serine protease involved in the pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2. *Microb. Pathog.* 48(3-4), 103-109.
- Hueck, C.J., Hillen, W., Saier, M.H., 1994. Analysis of a cis-active sequence mediating catabolite repression in gram-positive bacteria. *Res. Microbiol.* 145(7), 503-518.
- Hugenholtz, J., van Sinderen, D., Kok, J., Konings, W.N., 1987. Cell Wall-Associated Proteases of *Streptococcus cremoris* Wg2. *Appl. Environ. Microbiol.* 53(4), 853-859.
- Ibrahim, M., Guillot, A., Wessner, F., Algaron, F., Besset, C., Courtin, P., Gardan, R., Monnet, V., 2007. Control of the Transcription of a Short Gene Encoding a Cyclic Peptide in *Streptococcus thermophilus*: a New Quorum-Sensing System? *J. Bacteriol.* 189(24), 8844-8854.
- Iyer, R., Baliga, N.S., Camilli, A., 2005. Catabolite Control Protein A (CcpA) Contributes to Virulence and Regulation of Sugar Metabolism in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology.* 187(24), 8340-8349.
- Janulczyk, R., Rasmussen, M., 2001. Improved Pattern for Genome-Based Screening Identifies Novel Cell Wall-Attached Proteins in Gram-Positive Bacteria. *Infect. Immun.* 69(6), 4019-4026.
- Janzen, T., Kleinschmidt, J., Neve, H., Geis, A., 1992. Sequencing and characterization of pST1, a cryptic plasmid from *Streptococcus thermophilus*. *FEMS Microbiology Letters.* 175-180.
- Jenkinson, H., Baker, R., Tannock, G., 1996. A binding-lipoprotein-dependent oligopeptide transport system in *Streptococcus gordonii* essential for uptake of hexa- and heptapeptides. *J. Bacteriol.* 178(1), 68-77.
- Jones, N., Bohnsack, J.F., Takahashi, S., Oliver, K.A., Chan, M.-S., Kunst, F., Glaser, P., Rusniok, C., Crook, D.W.M., Harding, R.M., Bisharat, N., Spratt, B.G., 2003. Multilocus Sequence Typing System for Group B *Streptococcus*. *J. Clin. Microbiol.* 41(6), 2530-2536.
- Juilliard, V., 2007. Transport des acides aminés et des peptides, *Livre de bactéries lactiques*.
- Kawamura, Y., Hou, X.G., Sultana, F., Miura, H., 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. Syst. Bacteriol.* 45(2), 406-408.

- Kiefhaber, T., Quaas, R., Hahn, U., Schmid, F.X., 1990. Folding of ribonuclease T1. 2. Kinetic models for the folding and unfolding reactions. *Biochemistry*. 29(12), 3061-3070.
- Klein, J.R., Henrich, B., Plapp, R., 1994. Cloning and nucleotide sequence analysis of the *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* DSM7290 cysteine aminopeptidase gene pepC. *FEMS Microbiology Letters*. 124(3), 291-299.
- Kloosterman, T.G., Hendriksen, W.T., Bijlsma, J.J.E., Bootsma, H.J., van Hijum, S.A.F.T., Kok, J., Hermans, P.W.M., Kuipers, O.P., 2006. Regulation of Glutamine and Glutamate Metabolism by GlnR and GlnA in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Biological Chemistry*. 281(35), 25097 -25109.
- Knappe, J., Sawers, G., 1990. A radical-chemical route to acetyl-CoA: the anaerobically induced pyruvate formate-lyase system of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* 6(4), 383-398.
- Kunji, E.R., Smid, E.J., Plapp, R., Poolman, B., Konings, W.N., 1993. Di-tripeptides and oligopeptides are taken up via distinct transport mechanisms in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 175(7), 2052-2059.
- Kunji, E.R.S., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B., Konings, W.N., 1996. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 70(2), 187-221.
- Landgraf, J., Wu, J., Calvo, J., 1996. Effects of nutrition and growth rate on Lrp levels in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178(23), 6930-6936.
- Lanfermeijer, F.C., Picon, A., Konings, W.N., Poolman, B., 1999. Kinetics and consequences of binding of nona- and dodecapeptides to the oligopeptide binding protein (OppA) of *Lactococcus lactis*. *Biochemistry*. 38(44), 14440-14450.
- Lanie, J.A., Ng, W.-L., Kazmierczak, K.M., Andrzejewski, T.M., Davidsen, T.M., Wayne, K.J., Tettelin, H., Glass, J.I., 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(1), 38-51.
- Lawman, P., Bleiweis, A.S., 1991. Molecular cloning of the extracellular endodextranase of *Streptococcus salivarius*. *J. Bacteriol.* 173(23), 7423-7428.
- Lawrence, J.G., 1999. Gene transfer, speciation, and the evolution of bacterial genomes. *Current Opinion in Microbiology*. 2(5), 519-523.
- Lefébure, T., Stanhope, M.J., 2007. Evolution of the core and pan-genome of *Streptococcus*: positive selection, recombination, and genome composition. *Genome Biol.* 8(5), R71-R71.
- Len, A.C.L., Harty, D.W.S., Jacques, N.A., 2004. Proteome analysis of *Streptococcus mutans* metabolic phenotype during acid tolerance. *Microbiology*. 150(5), 1353-1366.
- Letort, C., Juillard, V., 2001. Development of a minimal chemically-defined medium for the exponential growth of *Streptococcus thermophilus*. *J. Appl. Microbiol.* 91(6), 1023-1029.
- Letort, C., Nardi, M., Garault, P., Monnet, V., Juillard, V., 2002. Casein Utilization by *Streptococcus thermophilus* Results in a Diauxic Growth in Milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(6), 3162-3165.
- Lin, R., D'Ari, R., Newman, E.B., 1992. Lambda placMu insertions in genes of the leucine regulon: extension of the regulon to genes not regulated by leucine. *J. Bacteriol.* 174(6), 1948-1955.
- Liu, F., Du, L., Du, P., Huo, G., 2009. Possible promoter regions within the proteolytic system in *Streptococcus thermophilus* and their interaction with the CodY homolog. *FEMS Microbiology Letters*. 297(2), 164-172.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Method. *Methods*. 25(4), 402-408.

- López-Torrejón, G., Martínez-Jiménez, M.I., Ayora, S., 2006. Role of LrpC from *Bacillus subtilis* in DNA transactions during DNA repair and recombination. *Nucleic Acids Res.* 34(1), 120-129.
- Luan, S.-L., Granlund, M., Sellin, M., Lagergard, T., Spratt, B.G., Norgren, M., 2005. Multilocus Sequence Typing of Swedish Invasive Group B *Streptococcus* Isolates Indicates a Neonatally Associated Genetic Lineage and Capsule Switching. *J. Clin. Microbiol.* 43(8), 3727-3733.
- Luesink, E.J., van Herpen, R.E., Grossiord, B.P., Kuipers, O.P., de Vos, W.M., 1998. Transcriptional activation of the glycolytic *las* operon and catabolite repression of the *gal* operon in *Lactococcus lactis* are mediated by the catabolite control protein CcpA. *Mol. Microbiol.* 30(4), 789-798.
- Lun, Z.-R., Wang, Q.-P., Chen, X.-G., Li, A.-X., Zhu, X.-Q., 2007. *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen. *The Lancet Infectious Diseases.* 7(3), 201-209.
- Lyon, W.R., Gibson, C.M., Caparon, M.G., 1998. A role for trigger factor and an *rgg*-like regulator in the transcription, secretion and processing of the cysteine proteinase of *Streptococcus pyogenes*. *EMBO J.* 17(21), 6263-6275.
- Lyon, W.R., Caparon, M.G., 2003. Trigger factor-mediated prolyl isomerization influences maturation of the *Streptococcus pyogenes* cysteine protease. *J. Bacteriol.* 185(12), 3661-3667.
- Mahr, K., Hillen, W., Titgemeyer, F., 2000. Carbon catabolite repression in *Lactobacillus pentosus*: analysis of the *ccpA* region. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(1), 277-283.
- 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., Díaz-Muñiz, 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., Mills, D., 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103(42), 15611-15616.
- Malke, H., Steiner, K., Ferretti, J.J., 2006a. Response of *Streptococcus pyogenes* to feast and famine conditions. *International Congress Series.* 1289, 135-138.
- Malke, H., Steiner, K., McShan, W.M., Ferretti, J.J., 2006b. Linking the nutritional status of *Streptococcus pyogenes* to alteration of transcriptional gene expression: The action of CodY and RelA. *International Journal of Medical Microbiology.* 296(4-5), 259-275.
- Mazmanian, S.K., Ton-That, H., Schneewind, O., 2001. Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology.* 40(5), 1049-1057.
- McIver, K., Scott, J., 1997. Role of *mga* in growth phase regulation of virulence genes of the group A streptococcus. *J. Bacteriol.* 179(16), 5178-5187.
- McLandsborough, L.A., Cleary, P.P., 1995. Insertional inactivation of *virR* in *Streptococcus pyogenes* M49 demonstrates that VirR functions as a positive regulator of *ScpA*, *FcRA*, *OF*, and *M* protein. *FEMS Microbiol. Lett.* 128(1), 45-51.
- McNab, R., Jenkinson, H.F., 1998. Altered adherence properties of a *Streptococcus gordonii* *hppA* (oligopeptide permease) mutant result from transcriptional effects on *cshA* adhesin gene expression. *Microbiology.* 144(1), 127-136.
- Molle, V., Nakaura, Y., Shivers, R.P., Yamaguchi, H., Losick, R., Fujita, Y., Sonenshein, A.L., 2003. Additional Targets of the *Bacillus subtilis* Global Regulator CodY Identified by Chromatin Immunoprecipitation and Genome-Wide Transcript Analysis.

- J. Bacteriol. 185(6), 1911-1922.
- Monnet, C., Nardi, M., Hols, P., Gulea, M., Corrieu, G., Monnet, V., 2003. Regulation of branched-chain amino acid biosynthesis by  $\beta$ -acetolactate decarboxylase in *Streptococcus thermophilus*. Letters in Applied Microbiology. 36(6), 399-405.
- Monnet, V., 2006. *Streptococcus thermophilus*, un streptocoque atypique et sympathique. Bull Soc Fr Microbiol. 23-28.
- Monnet, V., BARS, D.L., NEVIANI, E., GRIPON, J.C., 1987. Partial characterization and comparison of cell wall proteinases from 5 strains of *Streptococcus lactis*. Caractérisation partielle et comparaison des protéases de la paroi de 5 souches de *Streptococcus lactis*. Le Lait. 67(1), 11 pages.
- Morel, F., Frot-Coutaz, J., Aubel, D., Portalier, R., Atlan, D., 1999. Characterization of a prolidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNRZ 397 with an unusual regulation of biosynthesis. Microbiology (Reading, Engl.). 145 ( Pt 2), 437-446.
- Moreno, M.S., Schneider, B.L., Maile, R.R., Weyler, W., Saier, M.H., 2001. Catabolite repression mediated by the CcpA protein in *Bacillus subtilis*: novel modes of regulation revealed by whole-genome analyses. Molecular Microbiology. 39(5), 1366-1381.
- Morishita, T., Deguchi, Y., Yajima, M., Sakurai, T., Yura, T., 1981. Multiple nutritional requirements of lactobacilli: genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways. J. Bacteriol. 148(1), 64-71.
- Nardi, M., Chopin, M.C., Chopin, A., Cals, M.M., Gripon, J.C., 1991. Cloning and DNA sequence analysis of an X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase gene from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 763. Appl. Environ. Microbiol. 57(1), 45-50.
- Neviani, E., Giraffa, G., Brizzi, A., Carminati, D., 1995. Amino acid requirements and peptidase activities of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. J. Appl. Bacteriol. 79(3), 302-307.
- Newman, E.B., Lin, R., 1995. Leucine-responsive regulatory protein: a global regulator of gene expression in *E. coli*. Annu. Rev. Microbiol. 49, 747-775.
- Nou, X., Braaten, B., Kaltenbach, L., Low, D.A., 1995. Differential binding of Lrp to two sets of pap DNA binding sites mediated by Pap I regulates Pap phase variation in *Escherichia coli*. EMBO J. 14(23), 5785-5797.
- Ott, A., Germond, J.-E., Chaintreau, A., 2000. Origin of Acetaldehyde during Milk Fermentation Using <sup>13</sup>C-Labeled Precursors. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48(5), 1512-1517.
- Overweg, K., Kerr, A., Sluijter, M., Jackson, M.H., Mitchell, T.J., de Jong, A.P.J.M., de Groot, R., Hermans, P.W.M., 2000a. The Putative Proteinase Maturation Protein A of *Streptococcus pneumoniae* Is a Conserved Surface Protein with Potential To Elicit Protective Immune Responses. Infect. Immun. 68(7), 4180-4188.
- Overweg, K., Pericone, C.D., Verhoef, G.G.C., Weiser, J.N., Meiring, H.D., De Jong, A.P.J.M., De Groot, R., Hermans, P.W.M., 2000b. Differential Protein Expression in Phenotypic Variants of *Streptococcus pneumoniae*. Infect. Immun. 68(8), 4604-4610.
- Pallen, M.J., Wren, B.W., 1997. The HtrA family of serine proteases. Mol. Microbiol. 26(2), 209-221.
- Paterson, G.K., Mitchell, T.J., 2004. The biology of Gram-positive sortase enzymes. Trends in Microbiology. 12(2), 89-95.
- Pavlovic, G., Burrus, V., Gintz, B., Decaris, B., Guedon, G., 2004. Evolution of genomic islands by deletion and tandem accretion by site-specific recombination: ICES<sub>St1</sub>-related elements from *Streptococcus thermophilus*. Microbiology. 150(4), 759-774.
- Payne, J.W., Smith, M.W., 1994. Peptide transport by micro-organisms. Adv. Microb. Physiol. 36, 1-80.

- Perez, P.F., de Antoni, G.L., Añon, M.C., 1991. Formate Production by *Streptococcus thermophilus* Cultures. *Journal of Dairy Science*. 74(9), 2850-2854.
- Pernoud, S., Fremaux, C., Sepulchre, A., Corrieu, G., Monnet, C., 2004. Effect of the Metabolism of Urea on the Acidifying Activity of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Dairy Science*. 87(3), 550-555.
- Petranovic, D., Guedon, E., Sperandio, B., Delorme, C., Ehrlich, D., Renault, P., 2004. Intracellular effectors regulating the activity of the *Lactococcus lactis* CodY pleiotropic transcription regulator. *Mol Microbiol*. 53(2), 613-621.
- Piard, J.C., Hautefort, I., Fischetti, V.A., Ehrlich, S.D., Fons, M., Gruss, A., 1997. Cell wall anchoring of the *Streptococcus pyogenes* M6 protein in various lactic acid bacteria. *J. Bacteriol*. 179(9), 3068-3072.
- Platko, J.V., Calvo, J.M., 1993. Mutations affecting the ability of *Escherichia coli* Lrp to bind DNA, activate transcription, or respond to leucine. *J. Bacteriol*. 175(4), 1110-1117.
- Podbielski, A., Pohl, B., Woischnik, M., Körner, C., Schmidt, K.H., Rozdzinski, E., Leonard, B.A., 1996. Molecular characterization of group A streptococcal (GAS) oligopeptide permease (opp) and its effect on cysteine protease production. *Mol. Microbiol*. 21(5), 1087-1099.
- Poncet, S., Mijakovic, I., Nessler, S., Gueguen-Chaignon, V., Chaptal, V., Galinier, A., Boël, G., Mazé, A., Deutscher, J., 2004. HPr kinase/phosphorylase, a Walker motif A-containing bifunctional sensor enzyme controlling catabolite repression in Gram-positive bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*. 1697(1-2), 123-135.
- Poquet, I., Bolotin, A., Gruss, A., 2001. Optimisation de la production de protéines hétérologues exportées chez *Lactococcus lactis* par inactivation de HtrA, son unique protéase de ménage de surface. *Le Lait*. 81(1-2), 11.
- Poolman, B., 1993. Energy transduction in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 12(1-3), 125-147.
- Preis, H., Eckart, R.A., Gudipati, R.K., Heidrich, N., Brantl, S., 2009. CodY activates the transcription of a small RNA in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol*. JB.00602-09.
- Rahfeld, J.U., Rücknagel, K.P., Schelbert, B., Ludwig, B., Hacker, J., Mann, K., Fischer, G., 1994. Confirmation of the existence of a third family among peptidyl-prolyl cis/trans isomerases. Amino acid sequence and recombinant production of parvulin. *FEBS Lett*. 352(2), 180-184.
- Rallu, F., Gruss, A., Ehrlich, S.D., Maguin, E., 2000. Acid- and multistress-resistant mutants of *Lactococcus lactis*: identification of intracellular stress signals. *Mol. Microbiol*. 35(3), 517-528.
- Rallu, F., Gruss, A., Maguin, E., 1996. *Lactococcus lactis* and stress. *Antonie van Leeuwenhoek*. 70(2-4), 243-251.
- Rasmussen, M., Eden, A., Bjorck, L., 2000. SclA, a Novel Collagen-Like Surface Protein of *Streptococcus pyogenes*. *Infect. Immun*. 68(11), 6370-6377.
- Rasmussen, T.B., Danielsen, M., Valina, O., Garrigues, C., Johansen, E., Pedersen, M.B., 2008. *Streptococcus thermophilus* Core Genome: Comparative Genome Hybridization Study of 47 Strains. *Appl. Environ. Microbiol*. 74(15), 4703-4710.
- Ratnayake-Lecamwasam, M., Serror, P., Wong, K.-W., Sonenshein, A.L., 2001. *Bacillus subtilis* CodY represses early-stationary-phase genes by sensing GTP levels. *Genes & Development*. 15(9), 1093-1103.
- Raulo, S.M., Sorsa, T., Tervahartiala, T., Latvanen, T., Pirilä, E., Hirvonen, J., Maisi, P., 2002. Increase in milk metalloproteinase activity and vascular permeability in bovine endotoxin-induced and naturally occurring *Escherichia coli* mastitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 85(3-4), 137-145.
- Renna, M.C., Najimudin, N., Winik, L.R., Zahler, S.A., 1993. Regulation of the *Bacillus*

- subtilis alsS, alsD, and alsR genes involved in post-exponential-phase production of acetoin. *J. Bacteriol.* 175(12), 3863-3875.
- Rex, J.H., Aronson, B.D., Somerville, R.L., 1991. The *tdh* and *serA* operons of *Escherichia coli*: mutational analysis of the regulatory elements of leucine-responsive genes. *J. Bacteriol.* 173(19), 5944-5953.
- Ricca, E., Aker, D.A., Calvo, J.M., 1989. A protein that binds to the regulatory region of the *Escherichia coli* *ilvIH* operon. *J. Bacteriol.* 171(3), 1658-1664.
- de los Rios, S., Perona, J.J., 2007. Structure of the *Escherichia coli* leucine-responsive regulatory protein Lrp reveals a novel octameric assembly. *J. Mol. Biol.* 366(5), 1589-1602.
- Roesch, P.L., Blomfield, I.C., 1998. Leucine alters the interaction of the leucine-responsive regulatory protein (Lrp) with the *fim* switch to stimulate site-specific recombination in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 27(4), 751-761.
- Roissart, H., Luquet, F.M., 1994. *Bactéries lactiques: aspects fondamentaux et technologiques*. France, 605.
- Rul, F., Monnet, V., 1997. Presence of additional peptidases in *Streptococcus thermophilus* CNRZ 302 compared to *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Microbiology.* 82, 695-704.
- Rul, F., Monnet, V., Gripon, J.C., 1994. Purification and characterization of a general aminopeptidase (St-PepN) from *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* CNRZ 302. *J. Dairy Sci.* 77(10), 2880-2889.
- Rul, F., Gripon, J.-C., Monnet, V., 1995. St-PepA, a *Streptococcus thermophilus* aminopeptidase with high specificity for acidic residues. *Microbiology.* 141(9), 2281-2287.
- Saier, M.H., Chauvaux, S., Cook, G.M., Deutscher, J., Paulsen, I.T., Reizer, J., Ye, J.J., 1996. Catabolite repression and inducer control in Gram-positive bacteria. *Microbiology (Reading, Engl.)*. 142 ( Pt 2), 217-230.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 74(12), 5463 -5467.
- Savijoki, K., Ingmer, H., Varmanen, P., 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 71(4), 394-406.
- Schick, J., Weber, B., Klein, J.R., Henrich, B., 1999. PepR1, a CcpA-like transcription regulator of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. *Microbiology (Reading, Engl.)*. 145 ( Pt 11), 3147-3154.
- Schleifer, K.-H., Ehrmann, M., Beimfohr, C., Brockmann, E., Ludwig, W., Amann, R., 1995. Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal.* 5(8), 1081-1094.
- Schumacher, M.A., Seidel, G., Hillen, W., Brennan, R.G., 2007. Structural Mechanism for the Fine-tuning of CcpA Function by The Small Molecule Effectors Glucose 6-Phosphate and Fructose 1,6-Bisphosphate. *Journal of Molecular Biology.* 368(4), 1042-1050.
- Serror, P., Sonenshein, A.L., 1996. Interaction of CodY, a novel *Bacillus subtilis* DNA-binding protein, with the *dpp* promoter region. *Mol. Microbiol.* 20(4), 843-852.
- Shahbal, S., Hemme, D., Desmazeaud, M., 1991. High cell wall-associated proteinase activity of some *Streptococcus thermophilus* strains (H-strains) correlated with a high acidification rate in milk. *La forte activité protéinase de paroi de certaines souches de Streptococcus thermophilus (souches H) explique leur forte vitesse d'acidification du lait.* *Le Lait.* 71(3), 7 pages.
- Shahbal, S., Hemme, D., Renault, P., 1993. Characterization of a Cell Envelope-Associated Proteinase Activity from *Streptococcus thermophilus* H-Strains. *Appl. Environ.*

- Microbiol. 59(1), 177-182.
- Shinde, U.P., Liu, J.J., Inouye, M., 1997. Protein memory through altered folding mediated by intramolecular chaperones. *Nature*. 389(6650), 520-522.
- Shinde, U., Fu, X., Inouye, M., 1999. A pathway for conformational diversity in proteins mediated by intramolecular chaperones. *J. Biol. Chem.* 274(22), 15615-15621.
- Shivers, R.P., Sonenshein, A.L., 2005. *Bacillus subtilis* *ilvB* operon: an intersection of global regulons. *Mol. Microbiol.* 56(6), 1549-1559.
- Shivers, R.P., Dineen, S.S., Sonenshein, A.L., 2006. positive regulation of *bacillus subtilis acka* by *cody* and *ccpa*: establishing a potential hierarchy in carbon flow. *Molecular Microbiology*. 62(3), 811-822.
- Shivers, R.P., Sonenshein, A.L., 2004. Activation of the *Bacillus subtilis* global regulator CodY by direct interaction with branched-chain amino acids. *Mol Microbiol.* 53(2), 599-611.
- Siezen, R.J., 1999. Multi-domain, cell-envelope proteinases of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 76(1-4), 139-155.
- Siezen, R.J., Leunissen, J.A.M., 1997. Subtilases: The superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein Science*. 6(3), 501-523.
- Slack, F.J., Serror, P., Joyce, E., Sonenshein, A.L., 1995. A gene required for nutritional repression of the *Bacillus subtilis* dipeptide permease operon. *Mol. Microbiol.* 15(4), 689-702.
- Sonenshein, A.L., 2005. CodY, a global regulator of stationary phase and virulence in Gram-positive bacteria. *Current Opinion in Microbiology*. 8(2), 203-207.
- Stepaniak, L., Pripp, A.H., Sorhaug, T., others, 1998. Isolation and characterization of a 67 kDa oligopeptidase from *Propionibacterium freudenreichii* ATCC 9614 [cheese ripening]; Isolamento e caratterizzazione di uno 67 kDa oligopeptidasi da *Propionibacterium freudenreichii* TCC 9614 [maturazione del formaggio]. *Italian Journal of Food Science (Italy)*.
- Stiles, M.E., Holzapfel, W.H., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36(1), 1-29.
- Stoller, G., Tradler, T., Rücknagel, K.P., Rahfeld J-U, Fischer, G., 1996. An 11.8 kDa proteolytic fragment of the *E. coli* trigger factor represents the domain carrying the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity. *FEBS Lett.* 384(2), 117-122.
- Strauch, K.L., Beckwith, J., 1988. An *Escherichia coli* mutation preventing degradation of abnormal periplasmic proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 85(5), 1576 -1580.
- Stülke, J., Hillen, W., 1999. Carbon catabolite repression in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*. 2(2), 195-201.
- Subbian, E., Yabuta, Y., Shinde, U., 2004. Positive selection dictates the choice between kinetic and thermodynamic protein folding and stability in subtilases. *Biochemistry*. 43(45), 14348-14360.
- Sutcliffe, I.C., Harrington, D.J., 2002. Pattern searches for the identification of putative lipoprotein genes in Gram-positive bacterial genomes. *Microbiology*. 148(7), 2065-2077.
- Tam, R., Saier, M.H., 1993. Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 57(2), 320-346.
- Tamine, A.Y., Deeth, H.C., 1980. Yogurt: technology and biochemistry. *J. Food Protection*. 43, 939-977.
- Tan, P.S., Pos, K.M., Konings, W.N., 1991. Purification and characterization of an endopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. *Appl. Environ.*

- Microbiol. 57(12), 3593-3599.
- Tani, T.H., Khodursky, A., Blumenthal, R.M., Brown, P.O., Matthews, R.G., 2002. Adaptation to famine: a family of stationary-phase genes revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99(21), 13471-13476.
- Tao, K., Stearns, N.A., Dong, J., Wu, Q.L., Sahagian, G.G., 1994. The proregion of cathepsin L is required for proper folding, stability, and ER exit. *Arch. Biochem. Biophys.* 311(1), 19-27.
- Terzaghi, B.E., Sandine, W.E., 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl Microbiol.* 29(6), 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(5529), 498-506.
- Tettelin, H., Masignani, V., Cieslewicz, M.J., Eisen, J.A., Peterson, S., Wessels, M.R., Paulsen, I.T., Nelson, K.E., Margarit, I., Read, T.D., Madoff, L.C., Wolf, A.M., Beanan, M.J., Brinkac, L.M., Daugherty, S.C., DeBoy, R.T., Durkin, A.S., Kolonay, J.F., Madupu, R., Lewis, M.R., Radune, D., Fedorova, N.B., Scanlan, D., Khouri, H., Mulligan, S., Carty, H.A., Cline, R.T., Van Aken, S.E., Gill, J., Scarselli, M., Mora, M., Iacobini, E.T., Brettoni, C., Galli, G., Mariani, M., Vegni, F., Maione, D., Rinaudo, D., Rappuoli, R., Telford, J.L., Kasper, D.L., Grandi, G., Fraser, C.M., 2002. Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 99(19), 12391-12396.
- Thomas, S., Besset, C., Courtin, P., Rul, F., 2010. The role of aminopeptidase PepS in the growth of *Streptococcus thermophilus* is not restricted to nitrogen nutrition. *Journal of Applied Microbiology.* 108(1), 148-157.
- Tinson, W., Hillier, A.J., Jago, G.R., 1982. Metabolism of *Streptococcus thermophilus* 4. Utilization of Pyruvate and Citrate. *Australian Journal of Dairy Technology.* 37(1), 22-25.
- Tojo, S., Satomura, T., Morisaki, K., Deutscher, J., Hirooka, K., Fujita, Y., 2005. Elaborate transcription regulation of the *Bacillus subtilis* *ilv-leu* operon involved in the biosynthesis of branched-chain amino acids through global regulators of CcpA, CodY and TnrA. *Mol. Microbiol.* 56(6), 1560-1573.
- Ton-That, H., Marraffini, L.A., Schneewind, O., 2004. Sortases and pilin elements involved in pilus assembly of *Corynebacterium diphtheriae*. *Mol. Microbiol.* 53(1), 251-261.
- Tsakalidou, E., SAMELIS, J., METAXOPOULOS, J., KALANTZOPOULOS, G., 1997. Atypical leuconostoc-like *Weissella* strains isolated from meat, sharing low phenotypic relatedness with the so far recognized arginine-negative *Weissella* spp. as revealed by SDS-PAGE of whole cell proteins. *Syst Appl Microbiol.* 659-664.
- Tsau, J.-L., Guffanti, A.A., Montville, T.J., 1992. Conversion of Pyruvate to Acetoin Helps To Maintain pH Homeostasis in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(3), 891-894.
- Tynkkynen, S., Buist, G., Kunji, E., Kok, J., Poolman, B., Venema, G., Haandrikman, A., 1993. Genetic and biochemical characterization of the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 175(23), 7523-7532.
- Vaillancourt, K., LeMay, J.-D., Lamoureux, M., Frenette, M., Moineau, S., Vadeboncoeur,

- C., 2004. Characterization of a Galactokinase-Positive Recombinant Strain of *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(8), 4596-4603.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K., Swings, J., 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60(2), 407-438.
- Varshavsky, A., 1996. The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93(22), 12142-12149.
- Vaughan, E.E., van den Bogaard, P.T.C., Catzeddu, P., Kuipers, O.P., de Vos, W.M., 2001. Activation of Silent gal Genes in the lac-gal Regulon of *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.* 183(4), 1184-1194.
- Verheul, A., Rombouts, F.M., Abee, T., 1998. Utilization of Oligopeptides by *Listeria monocytogenes* Scott A. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(3), 1059-1065.
- Vesanto, E., Varmanen, P., Steele, J.L., Palva, A., 1994. Characterization and expression of the *Lactobacillus helveticus* pepC gene encoding a general aminopeptidase. *Eur. J. Biochem.* 224(3), 991-997.
- Vincent Juillard & Jean-Christophe Piard, 2008. Sujets de recherche.
- Vitikainen, M., Lappalainen, I., Seppala, R., Antelmann, H., Boer, H., Taira, S., Savilahti, H., Hecker, M., Vihinen, M., Sarvas, M., Kontinen, V.P., 2004. Structure-Function Analysis of PrsA Reveals Roles for the Parvulin-like and Flanking N- and C-terminal Domains in Protein Folding and Secretion in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry.* 279(18), 19302 -19314.
- Wang, Q., Calvo, J.M., 1993a. Lrp, a global regulatory protein of *Escherichia coli*, binds cooperatively to multiple sites and activates transcription of *ilvIH*. *J. Mol. Biol.* 229(2), 306-318.
- Wang, Q., Calvo, J.M., 1993b. Lrp, a major regulatory protein in *Escherichia coli*, bends DNA and can organize the assembly of a higher-order nucleoprotein structure. *EMBO J.* 12(6), 2495-2501.
- Wang, Q., Wu, J., Friedberg, D., Plakto, J., Calvo, J.M., 1994. Regulation of the *Escherichia coli* *lrp* gene. *J. Bacteriol.* 176(7), 1831-1839.
- Weickert, M.J., Chambliss, G.H., 1990. Site-directed mutagenesis of a catabolite repression operator sequence in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87(16), 6238-6242.
- Whiley, R.A., Beighton, D., 1998. Current classification of the oral streptococci. *Oral Microbiol Immunol.* 13(4), 195-216.
- Willins, D.A., Ryan, C.W., Platko, J.V., Calvo, J.M., 1991. Characterization of Lrp, and *Escherichia coli* regulatory protein that mediates a global response to leucine. *J. Biol. Chem.* 266(17), 10768-10774.
- Wohlrab, Y., Bockelmann, W., 1993. Purification and characterization of a second aminopeptidase (pepC-like) from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B14. *International Dairy Journal.* 3(8), 685-701.
- van der Woude, M.W., Kaltenbach, L.S., Low, D.A., 1995. Leucine-responsive regulatory protein plays dual roles as both an activator and a repressor of the *Escherichia coli* *pap* fimbrial operon. *Mol. Microbiol.* 17(2), 303-312.
- Yoshida, K.-ichi, Kobayashi, K., Miwa, Y., Kang, C.-M., Matsunaga, M., Yamaguchi, H., Tojo, S., Yamamoto, M., Nishi, R., Ogasawara, N., Nakayama, T., Fujita, Y., 2001. Combined transcriptome and proteome analysis as a powerful approach to study genes under glucose repression in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research.* 29(3), 683 -692.
- Zarnt, T., Tradler, T., Stoller, G., Scholz, C., Schmid, F.X., Fischer, G., 1997. Modular structure of the trigger factor required for high activity in protein folding. *J. Mol. Biol.* 271(5), 827-837.

- Zhi, J., Mathew, E., Freundlich, M., 1999. Lrp binds to two regions in the *dadAX* promoter region of *Escherichia coli* to repress and activate transcription directly. *Mol. Microbiol.* 32(1), 29-40.
- Zomer, A.L., Buist, G., Larsen, R., Kok, J., Kuipers, O.P., 2007. Time-Resolved Determination of the CcpA Regulon of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *J. Bacteriol.* 189(4), 1366-1381.

## **VII. Liste des Publications et Communications**

## **Production scientifique :**

### **Publications dans une revue internationale à comité de lecture**

Galia, W., Perrin, C., Genay, M., Dary, A. (2009)

Variability and molecular typing of *Streptococcus thermophilus* strains displaying different proteolytic and acidifying properties

International Dairy Journal, 19 (2), pp. 89-95.

Chang, O.K., Perrin, C., Galia, W., Saulnier, F., Miclo, L., Roux, E., Driou, A., Humbert, G., Dary, A. (2011) Release of the cell-envelope protease PrtS in the growth medium of *Streptococcus thermophilus* 4F44. Soumis à International Dairy Journal.

### **Communication internationale avec actes**

Galia, W., Perrin, C., Jameh, N., Genay, M., Dary, A.

Variability of the proteolytic properties in *Streptococcus thermophilus*.

4th IDF Dairy Science and Technology Week, 20-24 Avril 2009, Rennes, France.

### **Communications nationales avec actes**

#### Orale :

Galia, W

Etude de la variabilité du potentiel protéolytique de paroi chez *Streptococcus thermophilus* : caractérisation de la variabilité du gene *prts*.

Actes du séminaire de l'école doctorale RP2E, 15 janvier 2009, Nancy, France.

#### Posters :

Jameh, N., Perrin, C., Carré, J., Galia, W., Roux, E., Dary, A

Recherche du rôle de l'opéron *otsT* chez *Streptococcus thermophilus*

17e Colloque du Club des Bactéries Lactiques (CBL), 27-29 octobre 2010, Nancy, France.

Jameh, N., Perrin, C., Genay, M., Galia, W., Dary, A

Mise en évidence d'un système de transport de peptides potentiel chez *Streptococcus thermophilus*

Actes du séminaire de l'école doctorale RP2E, 28 janvier 2010, Nancy, France.

Chang, O.K., Perrin, C., Driou, A., Galia, W., Humbert, G., Miclo, L., Dary, A.  
Mise en évidence d'une endoprotéase extracellulaire chez *Streptococcus thermophilus*.  
Actes du séminaire de l'école doctorale RP2E, 15 janvier 2009, Nancy, France.

Chang, O.K., Perrin, C., Saulnier, F., Driou, A., Galia, W., Humbert, G., Miclo, L., Dary, A.  
Existence d'une forme extracellulaire de la protéase Prts chez *Streptococcus thermophilus*  
16<sup>ème</sup> Colloque du Club des Bactéries Lactiques Du 27 au 29 mai 2009 à Toulouse.

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE  
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL  
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Madame Christine DELORME, Chargée de Recherche, UGM, INRA de Jouy en Josas**

**Madame Véronique MONNET, Directeur de Recherche, INRA, UPGB de Jouy en Josas**

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

**Monsieur GALIA Wessam**

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,  
une thèse intitulée :

**"Caractérisation de la variabilité du système protéolytique de surface de la bactérie  
lactique *Streptococcus thermophilus*."**

en vue de l'obtention du titre de :

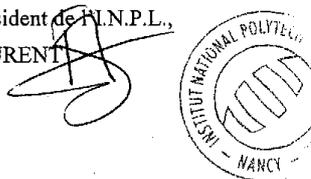
DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Sciences Agronomiques** »

Fait à Vandoeuvre, le 8 septembre 2011

Le Président de l'IN.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

## **Caractérisation de la variabilité du système protéolytique de surface de la bactérie lactique *Streptococcus thermophilus***

### **Résumé :**

La variabilité du système protéolytique de surface a été étudiée chez 30 souches de *St. thermophilus*. Cette variabilité consiste en la présence ou l'absence du gène *prtS*, en la présence de deux allèles différents de ce gène, en la présence d'une protéase PrtS ancrée et/ou soluble et enfin en l'expression variable, due à une variabilité de la régulation du système protéolytique, du gène *prtS* et d'autres gènes qui interviennent, pour la plupart, dans le métabolisme azoté. L'expression des gènes *prtS*, *pepX*, *pepC*, *pepN*, *amiA1CDEF*, *dtpT*, *livJHMGF*, *ilvC*, *ilvDBN*, *bcaT*, *ackA*, *ldh*, *codY* et *relA* a été quantifiée chez les souches PB302 et PB180 en lait et en milieu M17. La souche PB302 est représentative des souches qui se développent rapidement en lait alors que la souche PB180 l'est de celles qui ont une croissance intermédiaire dans ce milieu. Alors que l'expression des gènes étudiés est peu différente en milieu M17 où les deux souches ont une croissance similaire, cette expression diverge lorsque les deux souches sont cultivées en lait.

Globalement, la différence de croissance observée en lait entre les deux souches pourrait résulter d'une variabilité de la capacité protéolytique et de l'expression, entre autres, des gènes codant PrtS, le régulateur CodY, les transporteurs des oligopeptides (Ami), des di-tripeptides (DtpT) et des acides aminés ramifiés (LivJ) et de ceux codant des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des acides aminés ramifiés (IlvC, IlvB et BcaT), ces derniers étant nécessaires pour la croissance en lait. Tous ces gènes possèdent en amont de leur promoteur une boîte CodY potentielle et pourraient donc appartenir au régulon CodY.

**Mots clés :** *Streptococcus thermophilus*, système protéolytique, sortase A, régulation transcriptionnelle.

## Characterization of the variability of the proteolytic system of the lactic acid bacteria *Streptococcus thermophilus*

### Abstract :

The variability of the cell envelope-associated proteolytic system was studied in 30 strains of *St. thermophilus*. Variations in strains consist in the presence or absence of the gene *prtS*, the presence of two allelic forms of *prtS*, the presence of an anchored and/or soluble form of the protease PrtS and in the variable expression of the gene *prtS* and other genes involved mainly in nitrogen metabolism, thus in the variability of the regulation genetic of this system. Expression of the genes *prtS*, *pepX*, *pepC*, *pepN*, *amiA1CDEF*, *dtpT*, *livJHMGF*, *ilvC*, *ilvDBN*, *bcaT*, *ackA*, *ldh*, *codY* and *relA* was quantified in the PB302 and PB180 strains. The strain PB302 is representative of strains which exhibit a rapid growth in milk. The strain PB180 is representative those with intermediate growth in milk. In M17 medium, where both strains have similar growth, little difference in the expression of genes tested was observed. Conversely, the two strains did not express the selected genes in the same way when grown in milk. Overall, the difference in growth observed between strains in milk could result from variable proteolytic activities and variable expression of genes encoding, for example, the proteinase PrtS, the regulator CodY, transporters of oligo- or di-tri- peptides (Ami or DtpT) or branched chain amino acids, or BCAA (LivJ) and enzymes in the biosynthetic pathway of BCAA (IlvC, IlvB et BcaT) which are necessary for growth in milk. All these genes have a potential CodY box at the upstream of their promoter and could therefore belong to the regulon CodY.

**Keywords:** *Streptococcus thermophilus*, proteolytic system, sortase A, transcriptionnel regulation.