



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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



UNIVERSITÉ DE LORRAINE

École doctorale Sciences et Ingénierie des Ressources, Procédés, Produits, Environnement (RP2E)
Collegium Sciences & Technologies

THÈSE

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lorraine

Discipline « Procédés Biotechnologiques et Alimentaires »

par

Xavier LECOMTE

Soutenue publiquement le 27 Novembre 2014

Contribution des protéases pariétales dans l'activité des systèmes protéolytiques de surface de *Lactobacillus helveticus* et *Streptococcus thermophilus* en matrice laitière.

*Cell-envelope proteinases contribution to the activity of surface proteolytic systems of Lactobacillus
helveticus and Streptococcus thermophilus in dairy matrix.*

Membres du jury :

Président du jury

Pr. Jean-Luc GAILLARD

Professeur, Université de Caen Basse-Normandie

Rapporteurs

Dr. Véronique MONNET

Directeur de Recherche, INRA Jouy-en-Josas

Pr. Pascal DEGRAEVE

Professeur, Université de Lyon 1

Examineurs

Dr. Magali GENAY

Maître de Conférences, Université de Lorraine

Dr. Valérie GAGNAIRE

Chargé de Recherche HDR, INRA Rennes

Co-directrice de thèse

Pr. Annie DARY-MOUROT

Professeur, Université de Lorraine

Directrice de thèse

Unité de Recherche « Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux » (UR AFPA),

Université de Lorraine - INRA, Unité sous Contrat 340

Équipe « Protéolyse & Biofonctionnalités des Protéines et des Peptides » (PB2P)

Faculté des Sciences et Technologies, Université de Lorraine, F-54506 Vandœuvre-lès-Nancy

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier mes encadrantes et mon jury de thèse :

- Merci au Professeur Annie Dary-Mourot, ma directrice de thèse, qui m'a accueilli dans son équipe et permis d'approfondir mes connaissances dans mon domaine de prédilection, la génétique microbienne mais aussi d'élargir mes compétences à la biochimie. Merci d'avoir pris le temps de m'écouter et pour les quelques débats plus philosophiques que j'ai beaucoup appréciés.

- Merci au Docteur Magali Genay, ma co-directrice nancéienne, qui a su m'écouter à chaque fois que j'avais de nouvelles idées de constructions génétiques ou d'expérimentations. Merci aussi pour ton soutien et tes remarques constructives qui me permettaient de construire des argumentations solides avant de les soumettre à Annie et Valérie. Et oui c'est promis, j'irai écouter chanter à ton prochain concert ! :)

- Merci au Docteur Valérie Gagnaire, ma co-directrice rennaise, qui m'a fait découvrir la biochimie. Merci aussi pour ton soutien et ta patience tout au long de ma thèse et d'avoir su me guider lorsque j'écrivais ma première publication. J'ai aussi beaucoup apprécié la période des tests d'hydrolyse, tu es une super binôme ! :)

- Merci au Docteur Véronique Monnet et au Professeur Pascal Degraeve d'avoir accepté d'être mes rapporteurs et au Professeur Jean-Luc Gaillard d'avoir présidé mon jury de thèse.

Mon projet de thèse a été porté par deux laboratoires :

- Merci au Professeur Guido Rychen de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire l'Unité de Recherche Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux (UR AFPA) et à Madame le Professeur Annie Dary-Mourot et son équipe Protéolyse et Biofonctionnalités des Protéines et des Peptides (PB2P) de m'avoir laissé participer à la vie et l'organisation du laboratoire.

- Merci au Docteur Sylvie Lortal ainsi que son successeur le Docteur Joëlle Léonil, directrices du Laboratoire INRA de Science et Technologies du Lait et de l'Œuf (STLO) pour leur accueil au sein de leur laboratoire et à l'équipe Microstructure fromagère et Bactéries (Micro) dirigée par le Docteur Sylvie Lortal puis son successeur le Docteur Anne Thierry de m'avoir fait participer aux ateliers rédaction et aux formations collectives du laboratoire (doctorants-encadrants, Doctorama et Intelligence collective).

Mes trois années de doctorat ont été financées par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Ma quatrième année m'a permis de terminer ma thèse et de découvrir en même temps l'enseignement grâce à un poste d'Attaché Temporaire à l'Enseignement et à la Recherche (ATER) financé par l'Université de Lorraine.

La thèse c'est aussi des rencontres :

Je remercie tous mes collègues de l'UR AFPA et en particulier les membres de l'équipe PB2P qui ont partagé mon quotidien tout au long de mes quatre années de thèse sans oublier les doctorants et post-docs qui sont passés dans l'équipe : Aurélie, Oun-Ki, Wessam, Nawara, Nazir,

Hamed, Maira, Faïza, Zeeshan, Fleur, Ophélie et Mounira. Je vous remercie tous de votre soutien et pour les petits plus que vous m'avez apportés dans la vie au labo et qui m'ont permis de venir travailler le coeur léger tous les jours ! Merci à Delphine, Sophie, Justine, Elodie, Jessica, Agnès, Adeline, Christian Maxime et Sophie, mes partenaires de sorites ludiques et festives à Nancy. Mention spéciale pour Sophie et son soutien technique le jour de ma soutenance. ;)

Je remercie l'équipe Micro et tous mes collègues du STLO, mon deuxième laboratoire d'accueil, qui m'ont accueilli à bras ouverts dès mon arrivée. Je remercie Valérie et Rachel de m'avoir accueilli dans leur bureau et pour leurs conseils. Merci à l'équipe B2ISI qui a pris le temps de se réunir afin de discuter des problèmes que j'ai rencontrés lors de la caractérisation de mes mutants et quand la réussite de l'expression hétérologue était encore incertaine. Votre soutien m'a beaucoup touché dans cette période de doutes. Merci à mes deux « petites sœurs doctorantes » LiNa et Lélia qui ont toujours été présentes tant lors des bons moments que pendant les coups durs et qui ont su garder contact quand je suis reparti en Lorraine. Merci à Paulette et Jessica, pour leur soutien infailible, qui n'ont jamais hésité à me donner un coup de main et m'ont bien aidé dans la logistique de certaines manip (comme préparer et autoclaver des litres de laits et de milieux). Et que serait le STLO sans le goûter chez Paulette ! ;)

Les doctorants du STLO : François et les pauses clope ; Vincent et Coralie et le baby foot ; Lélia et Arlan, désolé pour les frayeurs que je vous ai faites mais c'était trop bon ;) ; Clem, qui m'ayant déconseillé de prendre un animal pendant ma thèse se retrouve maintenant avec une mini boule puante sur patte ! ; Naaman, mon adversaire de ping-pong qui a dû déclarer forfait en cours d'année ce qui m'a forcé à sombrer dans le baby foot le midi ; Rozenn et sa joie de vivre ; LiNa et sa franchise implacable : « Quand je vois où tu en es dans ta thèse, finalement je trouve que ma thèse va plutôt bien ! » ;). Merci aux membres du STLO et les SLF (sans laboratoire fixe) avec qui j'ai partagé de bons moments le midi au Badmington, Ping-pong, Baby foot ... mais aussi le soir au Knock, à La coloc de la goutte pendante, dans la rue St Michel et même à Bruz.... si si, c'est possible ;) !

Enfin merci à mes amis de toujours qui m'ont soutenu, Pitou, Héloïse, Manue, JB et Guillaume. Merci à toute ma famille qui a toujours été aux petits soins pour moi et bien sûr à mes parents qui m'ont soutenu et encouragé tout au long de mes études. Je ne les remercierai jamais assez pour leur confiance et surtout de m'avoir offert la liberté de faire mes propres choix.

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS	1
INTRODUCTION GENERALE, OBJECTIF ET STRATEGIES	5
I Introduction générale	7
II Objectif et stratégies	10
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE LE SYSTEME PROTEOLYTIQUE DE <i>L. HELVETICUS</i> ET DE <i>S. THERMOPHILUS</i>	13
I Présentation générale de <i>L. helveticus</i> et <i>S. thermophilus</i>	15
II Présentation globale du système protéolytique	17
II.A Les protéases à sérine de la famille des subtilisines	18
II.B Les Transporteurs des peptides	20
II.C Les Peptidases	21
III Les protéases pariétales	23
III.A Généralités sur les protéases de paroi des bactéries lactiques	23
III.B PrtS chez <i>S. thermophilus</i>	26
III.C Les protéases PrtH chez <i>L. helveticus</i>	30
III.D Homologie entre les protéases de paroi	34
IV Conclusion	41
CHAPITRE 1 EXPRESSION HETEROLOGUE D'UNE DES PROTEASES DE <i>L. HELVETICUS</i> CNRZ32 CIRM-BIA 103 CHEZ <i>S. THERMOPHILUS</i> LMD-9	43
I Introduction	45
II Les mécanismes d'activation de la compétence naturelle chez les streptocoques	45
III L'expression hétérologue chez <i>Streptococcus thermophilus</i>	51
III.A Les outils génétiques	51
III.B Les mécanismes de sécrétion	51
III.B.1 Le système Tat et le système Sec	51
III.B.2 Les systèmes chaperons	53
III.B.3 Les peptides signal	55

Table des matières

III.C	Les différents ancrages des protéines pariétales sur la paroi des bactéries lactiques	57
III.C.1	Le motif LPXTG et la sortase (SrtA)	57
III.C.2	Domaine d'attachement des protéines S-Layer	58
III.C.3	Les autres systèmes d'ancrage.....	59
III.D	L'environnement pariétal chez <i>L. helveticus</i> et <i>S. thermophilus</i> et son interaction avec les protéases pariétales.....	60
III.D.1	Les composants du peptidoglycane	60
III.D.2	Les acides téichoïques	63
III.D.3	Les protéines S-layer	63
IV	La souche naturellement compétente <i>Streptococcus thermophilus</i> LMD-9, un nouvel outil pour ancrer des protéines hétérologues sur la surface de la cellule. (Article)	67
V	Conclusion	99

CHAPITRE 2 RELATION ENTRE LE POTENTIEL PROTEOLYTIQUE DES SOUCHES DE *L. HELVETICUS* ET *S. THERMOPHILUS* SELON LES PROTEASES EXPRIMEES SUR LA PAROI ET ETUDE *IN SILICO* DE LA STRUCTURE SECONDAIRE DES PROTEASES PARIETALES DES BACTERIES LACTIQUES.....

101

I	Introduction.....	103
II	Les protéases de <i>Lactobacillus helveticus</i> et leurs capacités à hydrolyser les caséines α_{s1} et β à différentes concentrations de NaCl: de l' <i>in vitro</i> aux fromages suisses. (Article)	105
1	Introduction	110
2	Materials and Methods	111
2.1	Bacteria and growth conditions	111
2.2	<i>L. helveticus</i> strains characterizations.....	112
2.2.1	Genetic characterization.....	112
2.2.2	Acidification rate.....	112
2.2.3	Surface protein identification by shaving and tandem mass spectrometry	112
2.3	α_{s1} - and β -caseins in vitro hydrolysis.....	113
2.3.1	Assessment of casein hydrolysis	113
2.3.2	Tris-tricine SDS-PAGE	114
2.3.3	Peptide profile by RP-HPLC.....	114
2.4	In situ hydrolysis.....	115
2.4.1	Milk preparation and cheesemaking	115
2.4.2	Cheese analysis	116
2.4.3	Measurement of cheese functionalities	117
2.4.4	Preparation of the cheese water-soluble extracts (WSE)	118

Table des matières

2.4.5	Determination of the casein hydrolysis	118
2.4.6	Statistical Analyses.....	118
3	Results	119
3.1	Choice of <i>L. helveticus</i> and <i>S. thermophilus</i> strains	119
3.1.1	Choice and characterisation of <i>L. helveticus</i> strains.....	119
3.1.2	The choice of <i>S. thermophilus</i> strains.....	121
3.2	CEPs detection by shaving on the cell surface.....	121
3.3	In vitro purified α_{s1} - and β -casein hydrolysis	124
3.3.1	Casein hydrolysis.....	124
3.3.2	Peptide profiles of the most proteolytic strains	128
3.4	In situ hydrolysis in mini Swiss-type cheeses	130
3.4.1	Strains cultivability	130
3.4.2	Cheese proteolysis	134
3.4.3	Activity of CEPs in cheese	139
3.4.4	Textural parameters of cheese	139
4	Discussion	141
4.1	Strains characteristics and CEP expressions	141
4.2	In vitro proteolysis.....	143
4.3	In cheese.....	146
4.3.1	Strains cultivability.....	146
4.3.2	Cheese proteolysis.....	147
4.3.3	Activity of CEPs in cheese	148
5	Conclusion	149
6	References.....	151
7	Supplemental data	155
III	Analyses <i>in silico</i> des domaines des protéases de paroi de <i>L. helveticus</i> et focus sur PrtH3	158
III.A	Domaines et structures secondaires des protéases de paroi de <i>L. helveticus</i>	158
III.B	Les domaines de protéases de paroi PrtS, PrtH et PrtH2 :.....	166
III.C	Les protéases de paroi PrtH3 et PrtH4.....	167
III.D	Discussion	174
IV	Conclusion	176
	DISCUSSION-CONCLUSION ET PERSPECTIVES	179
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	191
	ANNEXE	207

VALORISATION DES RESULTATS & FORMATIONS	237
--	------------

Liste des abréviations

α_{s1} -CN	Caséine α_{s1}
α_{s2} -CN	Caséine α_{s2}
ABC	ATP-Binding Cassette
ACE	Enzyme de conversion de l'Angiotensine I
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ala	Alanine
Arg	Arginine
ARN	Acide ribonucléique
Asp	Asparagine
ATCC	American Type culture collection
ATP	Adénosine triphosphate
β -CN	Caséine β
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Ca^{2+}	Ions Calcium
CDM	Chemically defined medium
cDNA	ADN complémentaire
CEP	Cell Envelope Proteinase
CN	Caséine
CNIEL	Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière
CNRZ	Centre National de Recherche Zootechnie
Da	Dalton
Domaine AN	Domaine d'Ancrage à la paroi
Domaine H	Domaine Hélicoïdal
Domaine PP	Domaine pro-protéique
Domaine PR	Domaine catalytique
Domaine S	Domaine séquence signal
Domaine W	Domaine de la paroi
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
EFSA	Autorité européenne de sécurité des aliments
ESI	Ionisation par électrospray
FDA	Food and Drug Administration

Liste des abréviations

FDM	Fat in dry matter
Gln	Glutamine
Glu	Glutamate
GRAS	Generally recognised as safe
HCA	Hydrophobic cluster analysis
His	Histidine
IDF	International Dairy Federation
Ile	Isoleucine
INRA	Institut National de Recherche en Agroalimentaire
IS	Séquence d'Insertion
ITG	Institut Technique du Gruyère
kpb	kilo paire de base
<i>L. delbrueckii</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
<i>L. helveticus</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>
LAB	Bactéries lactiques
LC	Chromatographie liquide
<i>Lc. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
Leu	Leucine
LLH	Low-Low-Heat
LM17	Milieu M17 supplémenté en lactose
LPXTG	motif d'ancrage des protéines pariétales
Lys	Lysine
Met	Méthionine
Mg ²⁺	Ions Magnésium
MLST	Multi Locus Sequence Typing
MNFS	Moisture in non-fat substance
MRS	Milieu de Man, Rogosa et Sharpe
NaCl	Chlorure de sodium
NAG	N-acétyl-glucosamine
NAM	Acide N-acétyl-muramique
NPN	Non Protein nitrogen
OD	Optic density
PAGE	Gel d'électrophorèse de polyacrylamide

Liste des abréviations

pb	paire de base
PBS	Tampon phosphate salin
PCA	Principal component analysis
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
Phe	Phénylalanine
pI	Point isoélectrique
Pro	Proline
PrtB	Protéase de paroi de <i>L. delbrueckii</i>
PrtH, PrtH2, PrtH3 et PrtH4	Protéases de paroi de <i>L. helveticus</i>
PrtJ	Protéase de paroi de <i>L. johnsonii</i>
PrtP	Protéase de paroi de <i>Lc. lactis</i>
PrtR	Protéase de paroi de <i>L. rhamnosus</i>
PrtS	Protéase de paroi de <i>S. thermophilus</i>
PrtH ⁺ WANS	Protéase de paroi chimérique produite chez <i>S. thermophilus</i>
PTS	Systèmes de type phosphotransférase
QPS	Présomption d'innocuité reconnue
RP-HPLC	Chromatographie haute performance en phase liquide – en phase inverse.
RT-PCR	Reverse transcription - Réaction de polymérisation en chaîne
RT-qPCR	PCR quantitative en temps réel
<i>S. thermophilus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
SDS	Sodium dodécyl sulfate
Ser	Sérine
S-layer	Protéine de surface
SN	Soluble nitrogen
SRP	Particule de reconnaissance du signal.
SrtA	Sortase A
Système Sec	Système de sécrétion de protéines
Système Tat	Système de sécrétion de protéines
TCA	Acide trichloroacétique
TFA	Acide trifluoroacétique
Thr	Thréonine
TN	Total nitrogen

Liste des abréviations

Trp	Tryptophane
Tyr	Tyrosine
UCF	Unité formant colonie
UMR	Unité de recherche mixte
UpH	Unité pH
v/v	volume/volume
Val	Valine

Introduction générale, objectif et stratégies

I Introduction générale

Même si Hippocrate déclarait : « Que ta nourriture soit ton médicament et ton médicament ta nourriture », l'impact de l'alimentation sur la santé a longtemps été mis de côté puis revisité relativement récemment dans l'histoire du monde occidental contrairement à la culture orientale qui a conservé tout au long de son histoire cette relation alimentation-santé. Le monde occidental associe de plus en plus notre santé à la qualité de notre alimentation et certains produits alimentaires sont plébiscités pour leur potentiel bien-être. Parmi les composants alimentaires, les protéines ne sont pas seulement une source d'acides aminés mais représentent une source de peptides biofonctionnels ou encore qualifiés de bioactifs, c'est-à-dire de peptides qui sont de véritables signaux biologiques capables de moduler la physiologie du consommateur en exerçant des activités variées (anxiolytique, antihypertensive, antibactérienne, immunomodulante, opiacée, antithrombotique, anticholestérolémiant, ...). Jusqu'à présent, les protéines du lait sont considérées comme étant la source la plus importante de peptides bioactifs (Korhonen, 2009), notamment les caséines, protéines majoritaires du lait. Certains hydrolysats de protéines laitières ainsi que des laits fermentés riches en peptides bioactifs sont actuellement commercialisés, comme le lait fermenté EvolusTM (Valio Ltd, Finlande), le lait caillé CalpisTM ou Ameal STM (Calpis Co., Japan), BioZateTM (Davisco, USA) qui permettent la réduction de l'hypertension artérielle ou le LactiumTM (Ingredia, France) qui peut modérer la réponse tensionnelle au stress notamment chez les personnes particulièrement sensibles. Le développement d'aliments fonctionnels constitue donc un enjeu important dans la prévention des pathologies. Parmi eux, les produits laitiers fermentés possèdent plusieurs fonctionnalités intéressantes pouvant résulter de la présence de molécules tels que des peptides bioactifs ou des ferments lactiques utilisés. Ces derniers peuvent non seulement libérer les peptides bioactifs à partir des caséines au cours de la fermentation mais aussi agir chez le consommateur lors du transit intestinal. Enfin, les produits laitiers possèdent à la fois une image de santé mais aussi de plaisir. Par exemple, le yaourt, qui est très apprécié des consommateurs et consommé à hauteur de 29,3 kg/habitant/an en France (Figure 1), est le seul produit laitier ayant obtenu une allégation de l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) (EFSA Journal, 2010).



Figure 1 : Consommation moyenne de produits laitiers par Français en 2012 présenté sur le site du CNIEL d'après KantarWorldPanel (2013).

Les peptides qui sont encryptés dans la séquence des protéines alimentaires ne sont pas seulement bio-fonctionnels (peptides bioactifs) mais peuvent également présenter des propriétés techno-fonctionnelles. C'est ainsi qu'au niveau des protéines laitières, les caséines sont également une source de peptides qui vont avoir un impact sur les qualités texturantes (pouvoir moussant, émulsifiant ou viscoélasticité) et organoleptiques (amertume, flaveur ou arômes) du produit laitier fermenté.

L'effet bénéfique des produits laitiers fermentés est plébiscité par les consommateurs. Cependant les connaissances relatives à la production de peptides bio ou techno-fonctionnels à partir des protéines laitières, à l'influence des procédés de fabrications des produits laitiers fermentés sur cette production, à la biodisponibilité des peptides bioactifs *in vivo* ainsi qu'à leur mode d'action chez l'Homme sont encore peu renseignées et suscitent de nombreuses questions de recherche.

Les thématiques développées dans les deux équipes à l'origine de ce travail de thèse, l'équipe « Protéolyse et Bio-fonctionnalités des Protéines et des Peptides » de l'Unité de Recherche « Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux » et l'équipe « Microstructure fromagère et Bactéries » de l'UMR « Sciences et Technologies du Lait et de l'Œuf », concernent les produits laitiers fermentés, et le rôle de deux bactéries lactiques, *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus helveticus*, dans la production de peptides bioactifs et techno-fonctionnels. Ces deux espèces bactériennes font partie des ferments lactiques les plus utilisés dans l'industrie laitière à l'heure actuelle et sont connues pour leur capacité à générer des peptides bioactifs et techno-fonctionnels *via* la protéolyse des protéines laitières.

S. thermophilus et *L. helveticus* sont des co-levains, ou co-starters, utilisés notamment dans la fabrication de fromages à pâte pressée cuite tels que l’Emmental et le Comté. Ces bactéries à coloration Gram positive sont reconnues par la Food and Drug Administration (FDA) comme ayant le statut « generally recognised as safe » (GRAS) et évaluées comme QPS (présomption d’innocuité reconnue) par l’EFSA. Dans le lait, *L. helveticus* et *S. thermophilus* utilisent comme source de carbone le lactose, l’hydrolysant en galactose et glucose qui, après glycolyse, génère de l’acide pyruvique puis de l’acide lactique. Ceci provoque une baisse du pH, une déstructuration des micelles de caséines et aboutit au phénomène de coagulation et de synérèse. *L. helveticus* et *S. thermophilus* sont auxotrophes pour certains acides aminés et ne trouvent dans le lait qu’une source directe insuffisante de petits peptides et d’acides aminés libres pour subvenir à leurs besoins azotés pendant leur croissance, le lait étant principalement riche en protéines. Ces bactéries pallient ce manque au travers d’un système protéolytique complexe composé de protéases pariétales qui hydrolysent les protéines laitières en peptides, lesquels sont alors internalisés *via* des systèmes de transport puis hydrolysés par des peptidases intracellulaires, libérant ainsi un pool d’acides aminés et parmi eux les acides aminés essentiels qui diffèrent selon la souche utilisée. C’est lors de l’hydrolyse des protéines laitières qu’une partie des peptides bioactifs ou techno-fonctionnels sont générés, les autres pouvant l’être lors de la lyse cellulaire et la libération de peptidases intracellulaires actives durant les procédés de transformation des produits laitiers, par exemple en fromage. Ces peptides, s’ils ne sont pas internalisés par les bactéries, pourront ainsi jouer un rôle dans les propriétés bioactives et techno-fonctionnelles des produits fermentés finaux. Ainsi, mieux comprendre les phénomènes de protéolyse en matrice alimentaire permettrait de maîtriser l’hydrolyse des protéines laitières lors des processus de fabrication et donc de maîtriser les propriétés techno- et bio- fonctionnelles des produits laitiers fermentés afin de concevoir de façon raisonnée des aliments ayant des propriétés davantage ciblées.

II Objectif et stratégies

Mon travail de thèse avait pour objectif de mieux comprendre les propriétés protéolytiques de *L. helveticus* et *S. thermophilus*. Il s'agissait ainsi de déterminer comment le système protéolytique de ces bactéries lactiques thermophiles module le profil d'hydrolyse des caséines en matrice laitière. Nous nous sommes donc focalisés sur les premiers acteurs susceptibles de générer des peptides à partir des caséines du lait lors de la protéolyse : les protéases de paroi. La majorité des bactéries lactiques ne possèdent qu'une seule protéase de paroi comme *S. thermophilus*, dont certaines souches présentent une protéase nommée PrtS alors que d'autres sont dépourvues du gène *prtS* et/ou ne présentent pas d'activité protéolytique. *L. helveticus*, pour sa part, peut posséder selon les souches jusqu'à quatre gènes différents codant des protéases de paroi, nommés *prtH*, *prtH2*, *prtH3* et *prtH4* (Broadbent et al., 2011 ; Genay et al., 2009).

Une étude récente a comparé les potentiels protéolytiques des souches de *L. helveticus* possédant un ou deux gènes de protéase de paroi, à savoir, *prtH* et *prtH2* (Sadat-Mekmene et al., 2011b). Cependant, avec la complexité des équipements en protéases de paroi, avec non pas deux mais quatre gènes potentiels (Broadbent et al., 2011), le rôle et les activités de chacune des protéases sont encore partiellement connus. Nous avons donc cherché à approfondir nos connaissances sur chacune de ces protéases. Il est à noter que les méthodes biochimiques classiques d'extraction et de purification n'ont pas permis à ce jour d'isoler chacune des protéases afin d'étudier leur activité et leur spécificité et les outils génétiques existant chez *L. helveticus* ne permettent pas non plus la construction aisée de mutants en vue d'inactiver ou de surexprimer un des gènes codant les protéases.

Aussi, et afin d'étudier l'activité et la spécificité de chacune des protéases de *L. helveticus*, 2 stratégies complémentaires ont été retenues.

- La première a consisté à créer des mutants exprimant chacun une protéase. En raison du manque d'outils génétiques appropriés chez *L. helveticus*, nous avons choisi d'exprimer de façon hétérologue les protéases de *L. helveticus* CNRZ32 CIRM-BIA 103. Nous avons utilisé pour cela *S. thermophilus* LMD-9. Cette stratégie permet de s'affranchir des biais inhérents à la non-isogénicité des souches de *L. helveticus*. Cette stratégie a nécessité la mise au point d'un outil de sécrétion hétérologue basé sur la substitution de la protéase PrtS de *S. thermophilus* par une des protéases de *L. helveticus* CNRZ32 CIRM-BIA 103.

- La deuxième stratégie a consisté à étudier la spécificité de substrat et de coupure du système protéolytique de surface de souches de *L. helveticus* et de souches de *S. thermophilus*

ne comportant qu'un seul ou aucun gène de protéase de paroi dans leur génome. Ainsi, l'activité protéolytique de souches de *L. helveticus* ne possédant qu'un gène de protéase de paroi a été comparée à celle de la souche CNRZ32 CIRM-BIA 103 qui possède 4 protéases et qui nous a servi de référence tout au long de ce travail. De plus, des souches de *S. thermophilus* exprimant ou non la protéase de paroi PrtS ont été utilisées. L'hydrolyse des caséines par le système protéolytique des souches de *L. helveticus* et de *S. thermophilus* a tout d'abord été réalisée *in vitro* en mimant les paramètres physicochimiques du fromage. Une deuxième étape, *in situ*, a consisté en la fabrication de fromages en utilisant les différentes souches de *L. helveticus* précédemment sélectionnées.

Mes travaux de thèse s'articulent autour de deux axes correspondant chacun à une des stratégies précédemment exposées.

Synthèse bibliographique
Le système protéolytique de *L. helveticus* et
de *S. thermophilus*

I Présentation générale de *L. helveticus* et *S. thermophilus*

Les bactéries lactiques sont des bactéries à coloration Gram positive, immobiles, asporogènes, anaérobies mais aérotolérantes dont l'ADN est composé d'un faible taux en bases G et C. Elles sont capables de produire de l'acide lactique par fermentation des glucides et sont dites homofermentaires lorsqu'elles produisent essentiellement de l'acide lactique à partir du glucose et hétérofermentaires lorsqu'elles produisent de l'acide lactique, du CO₂ et de l'éthanol et/ou de l'acide acétique. Bien que cette définition regroupe de nombreux genres bactériens, ce sont plutôt les espèces utilisées dans la fermentation de produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les plantes ou encore les fruits qui appartiennent à la famille des bactéries lactiques (Vandamme et al., 1996).

Deux modèles de bactéries lactiques ont été étudiés dans ce travail, *Lactobacillus helveticus* et *Streptococcus thermophilus*. Ces deux organismes utilisés comme levain mixte dans la fabrication de fromages à pâte pressée cuite (Comté ou Emmental) ou à pâte filée (Mozzarella) sont des bactéries lactiques homofermentaires, thermophiles (croissance optimale à des températures avoisinant les 42°C). Ces deux espèces utilisent le lactose du lait comme source de carbone en l'hydrolysant en glucose et galactose pour ensuite cataboliser le glucose. *L. helveticus* et quelques souches de *S. thermophilus* sont capables de cataboliser le galactose après avoir épuisé le glucose présent dans le milieu. De plus, le lait est une importante source d'azote, de par sa forte teneur en protéines (30 à 35 g/L) (CNIEL) parmi lesquelles *S. thermophilus* et *L. helveticus* puisent les acides aminés qui leur sont essentiels. En effet, les souches de *L. helveticus* peuvent être auxotrophes pour un grand nombre d'acides aminés, pouvant aller jusqu'à 14, alors que les souches de *S. thermophilus* sont auxotrophes pour au plus six acides aminés (Letort et Juillard, 2001). Enfin, les capacités autolytiques varient entre les deux espèces mais aussi entre les souches (Christensen et Steele, 2003 ; Christiansen et al., 2008). Ainsi, *L. helveticus* est très appréciée pour son fort taux de lyse cellulaire lors de la fabrication fromagère, ce qui permet la libération des peptidases intracellulaires et contribue à l'affinage des fromages (Lortal et Chapot-Chartier, 2005). Concernant *S. thermophilus*, sa lyse a été détectée dans l'Emmental (Deutsch et al., 2002) mais aucune autre donnée n'existe sur la lyse de *S. thermophilus* dans les yaourts ou d'autres fromages comme le Camembert ou le Reblochon alors que ce starter y est fréquemment ajouté pour accélérer la phase d'acidification initiale (Lortal et Chapot-Chartier, 2005).

S. thermophilus est très utilisée dans l'industrie alimentaire tant dans les fromages, les yaourts ou les laits fermentés comme le Kéfir (Drider et Prévost, 2009). En raison de cette

large utilisation, une forte diversité génétique au sein de l'espèce *S. thermophilus* était attendue. Cependant, des travaux comparant trois génomes séquencés de *S. thermophilus* (Bolotin et al., 2004 ; Hols et al., 2005) ou encore des comparaisons de différents gènes de ménages présents dans 27 souches par « Multi Locus Sequence Typing » (MLST) (Delorme et al., 2010 ; Junjua, 2013) ont montré une faible variabilité génétique entre les souches de cette espèce. Ainsi, parmi les souches de *S. thermophilus* dont les génomes ont été séquencés, les différences essentielles détectées 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 ; Goh et al., 2011 ; Horvath et al., 2008 ; Rasmussen et al., 2008). Enfin, d'après Delorme et al (2010), *S. thermophilus* serait une espèce clonale issue de *S. salivarius*, ou *S. vestibularis*, qui aurait récemment émergé. En effet, *S. thermophilus* est la seule espèce de streptocoques reconnue comme non-pathogène. La comparaison du génome de *S. thermophilus* avec les autres génomes des streptocoques a montré une perte des principaux gènes de virulence allant probablement de pair avec l'adaptation de cette espèce à la seule niche écologique connue pour cette espèce, à savoir le lait (Bolotin et al., 2004).

Chez *L. helveticus*, seules quelques études sur la diversité génétique ont été publiées. Ainsi, l'étude de la nature et de la localisation d'éléments transposables de type IS (Insertion Sequence) dans le génome de *L. helveticus* DPC 4571 et d'autres génomes de lactobacilles a révélé une différence entre ces génomes. Bien que *L. helveticus* DPC 4571 et *L. acidophilus* NCFM soient très proches phylogénétiquement (1,6 % de différence au niveau de leurs ARN 16S), elles colonisent 2 niches différentes, respectivement le lait et le tractus gastro-intestinal. Ainsi, les souches DPC 4571 et NCFM possèdent les mêmes types de gènes codant des peptidases et de gènes impliqués dans la lyse cellulaire. En revanche, la moitié des gènes impliqués dans les systèmes de type phosphotransférase (systèmes PTS), codant des protéines ancrées à la paroi et toutes les protéines d'attachement au mucus présents chez *L. acidophilus* NCFM ont été perdus ou sont présents sous forme de pseudogènes chez *L. helveticus* DPC 4571 (Callanan et al., 2008). Tout comme chez *S. thermophilus* (Bolotin et al., 2004), les génomes des souches de lactobacilles issues du lait varient moins que ceux des souches intestinales (Callanan et al., 2008). Enfin, l'étude des génomes de 38 souches de *L. helveticus* par Broadbent et al (2011) a révélé que la variabilité d'activité peptidasique ou du métabolisme des acides aminés ne résulte pas d'une absence des gènes concernés mais plutôt d'une variabilité allélique qui affecterait la régulation de ces gènes et/ou l'activité spécifique des enzymes. A l'opposé, les protéases de paroi dérogent à cette règle par la présence ou

l'absence d'un ou plusieurs des quatre gènes connus chez cette espèce tout comme des deux maturases qui leur sont associées.

II Présentation globale du système protéolytique

Le système protéolytique des bactéries lactiques en général et donc de *S. thermophilus* et de *L. helveticus* en particulier, comporte trois acteurs majeurs : les protéases de paroi, les systèmes de transport et les peptidases intracellulaires (Figure 2). Les protéases pariétales hydrolysent les protéines en peptides, qui sont alors pris en charge par des systèmes de transport au travers de la membrane plasmique de la cellule bactérienne et enfin, les peptidases intracellulaires hydrolysent à leur tour les peptides en acides aminés (Dridet et Prévost, 2009). Chez *Lactococcus lactis*, ce système est régulé par le répresseur transcriptionnel CodY, qui détecte les acides aminés branchés libres dans le cytoplasme et s'en sert de cofacteurs pour réprimer les gènes du système protéolytique (Savijoki et al., 2006), comme le montre la Figure 2. Chez *S. thermophilus*, une boîte CodY a été retrouvée en amont du gène *priS* chez des souches possédant ce gène (Galia et al., 2009). Chez *L. helveticus*, et plus largement chez les lactobacilles, aucune boîte CodY ni aucun gène *codY* n'a été identifiée dans les génomes séquencés. Le système protéolytique pourrait être régulé par un autre système de régulation comme le système de régulation à deux composants (RS) retrouvé chez *L. acidophilus* (Azcarate-Peril et al., 2005 ; Sadat-Mekmene et al., 2011a).

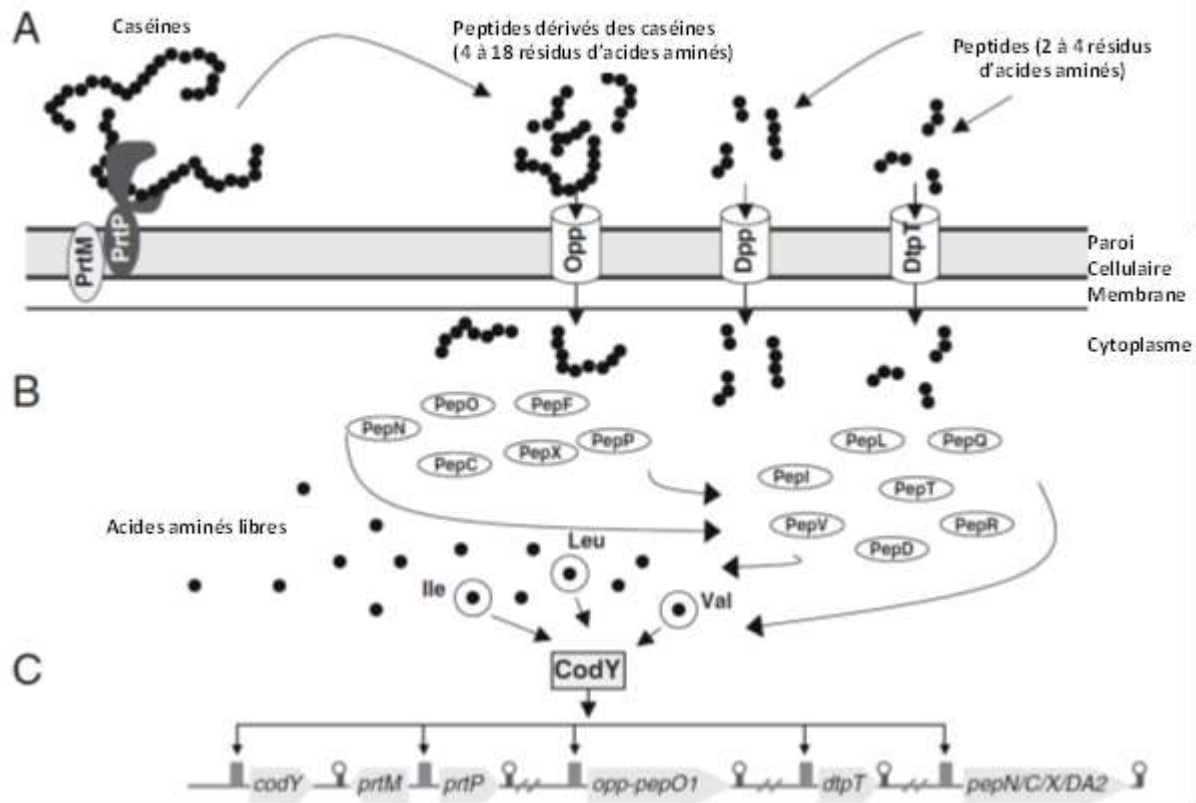


Figure 2 : Présentation du système protéolytique de *Lc. lactis* et de sa régulation *via* le répresseur CodY. A) Les caséines du lait sont d'abord hydrolysées par la protéase de paroi PrtP (homologue de PrtH et PrtS de *L. helveticus* et *S. thermophilus*) puis les peptides formés sont internalisés *via* des transporteurs membranaires spécifiques de ces peptides (Opp pour les oligopeptides, et Dpp et DtpT spécifiques des di- aux nona-peptides). B) Une fois internalisés, les peptides sont hydrolysés par des peptidases intracellulaires générant des acides aminés libres. C) Ces acides aminés libres vont interagir avec le répresseur CodY qui, ainsi activé, va pouvoir réprimer l'expression des gènes possédant une boîte CodY en amont de leur promoteur (Savijoki et al., 2006).

II.A Les protéases à sérine de la famille des subtilisines

Chez les bactéries lactiques, les protéases pariétales sont classées parmi les protéases à sérine de la famille des subtilisines et appartiennent au sous-groupe des protéases attachées à la paroi ou lactocépines (EC 3.4.21.96). Elles possèdent une activité endopeptidasique à large spécificité de coupure avec une préférence pour les résidus encombrants (dont les chaînes latérales génèrent un encombrement stérique important) non chargés (Exterkate et al., 1993 ; Visser et al., 1991). Les subtilisines (Figure 3), retrouvées dans tout le règne du vivant, sont caractérisées par la triade catalytique Asp, His et Ser. Ces trois acides aminés sont éloignés dans la structure primaire du site catalytique mais sont toujours retrouvés dans cet ordre précis : Asp, His et Ser. La structure tertiaire du domaine catalytique est organisée en feuillets β et hélices α , et les 3 résidus de la triade sont reliés par des séquences variables qui sont présentes surtout à l'extérieur du site catalytique (Siezen et Leunissen, 1997).

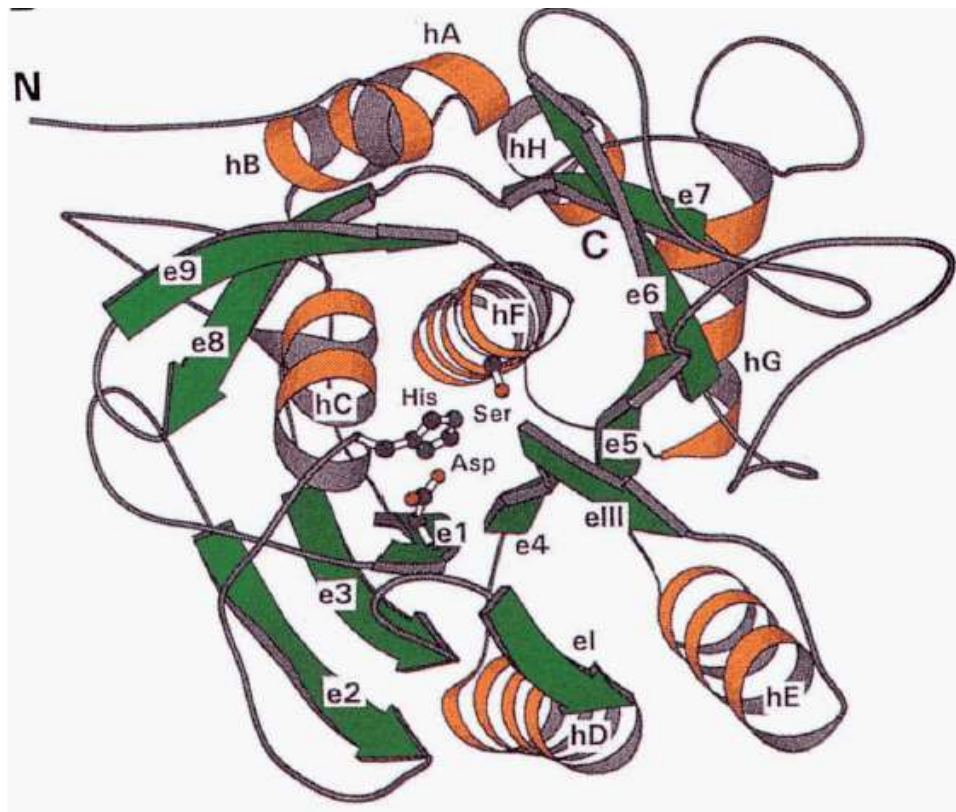


Figure 3 : Représentation schématique de la structure secondaire et tertiaire des subtilisines (PDB code 2SNI) avec les hélices α représentées par des cylindres et les feuillets β par des flèches. La triade catalytique y est représentée au centre du schéma (asparagine (Asp), histidine (His) et sérine (Ser)) (Siezen et Leunissen, 1997).

La majeure partie des subtilisines sont constituées de peu de domaines hormis leur site catalytique. A l'opposé, les protéases pariétales des bactéries lactiques possèdent des domaines additionnels comme des domaines de reconnaissance de substrats et des domaines leur permettant d'être sécrétées et ancrées à la surface de la cellule. De plus, deux sites de liaison du calcium sont fréquemment retrouvés au niveau du site catalytique et assureraient la stabilité et l'activité de la protéase (Siezen, 1999 ; Siezen et Leunissen, 1997). Enfin, les protéases pariétales des bactéries lactiques sont classées en deux types de protéases P_I et P_{III} qui ont été définis d'après la première protéase étudiée : PrtP de *Lc. lactis*. Ces types de protéases définissent leurs capacités à hydrolyser spécifiquement les caséines. Ainsi, les protéases de type P_I hydrolysent de manière prédominante les caséines β plutôt que les caséines α_s et les protéases P_{III} clivent les caséines β , α_{s1} et κ (Kunji et al., 1996 ; Pritchard et Coolbear, 1993 ; Visser et al., 1986). La protéase PrtS correspond au type P_I/P_{III} car elle hydrolyse la caséine β et, dans une moindre mesure, la caséine α_{s1} (Fernandez-Esplá et al., 2000 ; Miclo et al., 2012). D'après Pederson et al, (1999), la protéase PrtH de *L. helveticus* ne peut pas être classée d'après cette classification à cause des nombreuses substitutions

retrouvées dans son site de reconnaissance des substrats. Cette remarque a été étendue à toutes les protéases de paroi de *L. helveticus* (Sadat-Mekmene et al., 2011a).

II.B Les Transporteurs des peptides

Le transport des peptides générés par les protéases de paroi est géré par des systèmes de transports de type ABC (ATP-Binding Cassette) appelés Ami ou Opp pour le transport d'oligopeptides, Dpp pour le transport des di- aux nona-peptides et DtpT pour le transport des di- et tripeptides chez les bactéries à coloration Gram positive (Figure 2). Ces systèmes hydrolysent de l'ATP pour fournir l'énergie nécessaire au transport des peptides par les perméases. Ces dernières sont associées à des protéines ancrées à la membrane ayant une affinité pour les peptides et qui vont présenter ces peptides aux perméases.

Des études ont été menées pour déterminer la taille maximale des peptides pouvant être internalisés par les différents systèmes de transports de peptides chez différentes espèces bactériennes (Tableau 1). Ainsi, il a été montré que *S. thermophilus* peut internaliser des peptides allant jusqu'à 23 résidus d'acides aminés *via* le transporteur ABC Ami (Garault et al., 2002 ; Juille et al., 2005).

Synthèse bibliographique

Tableau 1 : Taille des peptides incorporés par des transporteurs de peptides bactériens de type ABC chez quelques espèces bactériennes (Jameh, 2012)

Organisme	Nom du système	Taille des peptides transportés (résidus)	Références
<i>Lactococcus lactis</i>	Opt	3-6 ^a	(Foucaud et al., 1995 ; Lamarque et al., 2004)
<i>Lactococcus lactis</i>	Opp	4-18	(Doeven et al., 2004)
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Ami	3-23	(Garault et al., 2002)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Dpp	2	(Samen et al., 2004)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Opp	2-6 ^b	(Samen et al., 2004)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Dpp	2	(Podbielski et Leonard, 1998)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Opp	6 ^c	(Podbielski et Leonard, 1998)
<i>Streptococcus gordonii</i>	Hpp	6-7	(Jenkinson et al., 1996)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Ami	2-7 ^b	(Alloing et al., 1994)
<i>Streptococcus uberis</i>	Opp	3-8	(Taylor et al., 2003)
<i>Bacillus subtilis</i>	Opp	3-5 ^b	(Koide et Hoch, 1994 ; Picon et Van Wely, 2001)
<i>Bacillus subtilis</i>	App	4-9 ^b	(Koide et Hoch, 1994 ; Levdikov et al., 2005)
<i>Escherichia coli</i>	Opp	2-5 ^b	(Alves et Payne, 1980 ; Guyer et al., 1986)
<i>Escherichia coli</i>	Dpp	2-3	(Abouhamad et Manson, 1994 ; Dunten et Mowbray, 1995 ; Nickitenko et al., 1995)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Opp	3-8	(Borezee et al., 2000 ; Verheul et al., 1998)

^a La taille des peptides transportés change selon les souches, le système Opt possède une ou deux protéines affines

dont la spécificité de transport est variée

^b Indique qu'aucun ou très peu de peptides de taille supérieure à celle indiquée ont été testés dans l'étude.

^c Des hexapeptides ont été uniquement testés.

II.C Les Peptidases

Les peptides internalisés vont ensuite être hydrolysés en acides aminés libres par des peptidases intracellulaires. Le nombre des peptidases et leurs spécificités de substrat varient selon l'espèce et la souche bactérienne. *S. thermophilus* et *L. helveticus* possèdent de nombreuses peptidases présentées dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 : Peptidases identifiées dans les génomes séquencés de *L. helveticus* CNRZ32 (broadbent et al, 2011) et *S. thermophilus* LMD-9 (Jameh, 2013)

<i>L. helveticus</i> CNRZ 32	<i>S. thermophilus</i> LMD-9	<i>L. helveticus</i> CNRZ 32	<i>S. thermophilus</i> LMD-9
Oligoendopeptidases		Peptidases spécifiques de la proline	
PepE		PepX	PepX
PepE2		PepI	
	PepF/PepB	PepR	
PepF	PepF	PepQ	PepQ
PepO	PepO	PepQ2	
PepO2			PepP
PepO3		Di- et tri-peptidases	
Gcp	Gcp	PepD	
aminopeptidases générales		PepD2	
PepC (pseudogène)	PepC	PepD3	
PepCE		PepD4	
PepN	PepN	PepD5 (pseudogène)	
Aminopeptidases spécifiques		PepV	PepV
	PepS	PepT	PepT
	PepA	PepT2	
	PepM		

Certaines peptidases peuvent être retrouvées à la surface de la cellule. Ainsi, des activités aminopeptidasiques ont été détectées à la surface de cellules intactes de *Lc. lactis*, (Exterkate, 1984) et une peptidase a pu être purifiée (Geis et al., 1985). De même, d'autres activités aminopeptidasiques ont été détectées chez *L. helveticus* (Blanc et al., 1993 ; Miyakawa et al., 1992). Pourtant, bien que ces peptidases aient été identifiées à la surface, elles ne possèdent pas de domaine permettant de prédire leur sécrétion (peptide signal) comme c'est aussi le cas de la X prolyl-dipeptidyl peptidase (PepX) de *Streptococcus gordonii* (Goldstein et al., 2001). Cependant, chez la souche *S. gordonii* Challis substr. CH1, une X-prolyl dipeptidylaminopeptidase (SGO_1415) a été séquencée (Vickerman et al., 2007) et présente deux domaines supplémentaires par rapport aux autres peptidases PepX séquencées : une séquence signal et un domaine d'ancrage à la paroi de type LPXTG. Il est à noter que la souche *S. gordonii* Challis substr. CH1 possède une autre peptidase PepX (SGO_0234). Cette X-prolyl dipeptidylaminopeptidase ancrée à la paroi par un motif LPXTG et qui partage une région similaire à 45% avec PepX (SGO_1415) semble être une exception parmi les streptocoques. Cependant, cette PepX sécrétée mais n'est pas

retrouvée chez *S. thermophilus*. Pourtant, des activités aminopeptidasiques ont été détectées à la surface de la souche LMD-9, ainsi que d'autres activités peptidasiques comme une activité X-prolyl-dipeptidyl peptidase, (Hafeez et al., 2013) (Hafeez, 2013).

Ces peptidases extracellulaires peuvent cliver les peptides résultant de l'hydrolyse des protéases pariétales et ainsi permettre à la cellule bactérienne d'internaliser plus de peptides qui, jusque-là, lui étaient inaccessibles. Cette constatation assez récente nous amène à nous interroger sur des résultats antérieurs qui concernent la taille maximale des peptides internalisés par *S. thermophilus* (23 résidus). En effet, les peptides utilisés dans ces études possèdent tous des résidus prolines qui pourraient être clivés par la forme extracellulaire de PepX. Cependant, Garault et al. (2002) précisent qu'une forme intacte du peptide de 23 résidus est retrouvée dans le surnageant de culture chez les mutants AmiA3/PrtS⁻, excluant dans ce cas l'action d'une peptidase. Toutefois, cette activité peptidasique ne doit pas être oubliée lors de la caractérisation de l'activité protéolytique à la surface des bactéries.

Dans le système protéolytique présenté ci-dessus, les protéases pariétales sont les premiers acteurs de la protéolyse et pour que cette dernière soit optimale, elles doivent se retrouver dans un environnement physicochimique adéquat. Leur localisation extracellulaire implique donc des interactions avec le milieu extracellulaire et la paroi bactérienne. Afin de maîtriser, *in fine*, l'hydrolyse des caséines lors des procédés de fabrication des produits laitiers fermentés, il est donc nécessaire de mieux connaître les différentes caractéristiques des protéases pariétales sans oublier les autres acteurs potentiels de la protéolyse.

III Les protéases pariétales

III.A Généralités sur les protéases de paroi des bactéries lactiques

Les protéases pariétales de *L. helveticus* et *S. thermophilus* sont organisées en différents domaines (Figure 4) qui ont été définis par homologie avec les protéases de paroi des autres bactéries lactiques telles que PrtP de *Lc. lactis*, PrtB de *L. bulgaricus* ou encore PrtR de *L. rhamnosus* (Sadat-Mekmene et al., 2011a). Elles possèdent en N-terminal une séquence signal (domaine S) qui est reconnue par le système de sécrétion Sec Responsable de l'export de la pré-pro-protéine à travers la membrane plasmique, le domaine S est coupé lors de la sécrétion *via* le système Sec, libérant ainsi une pro-protéine.

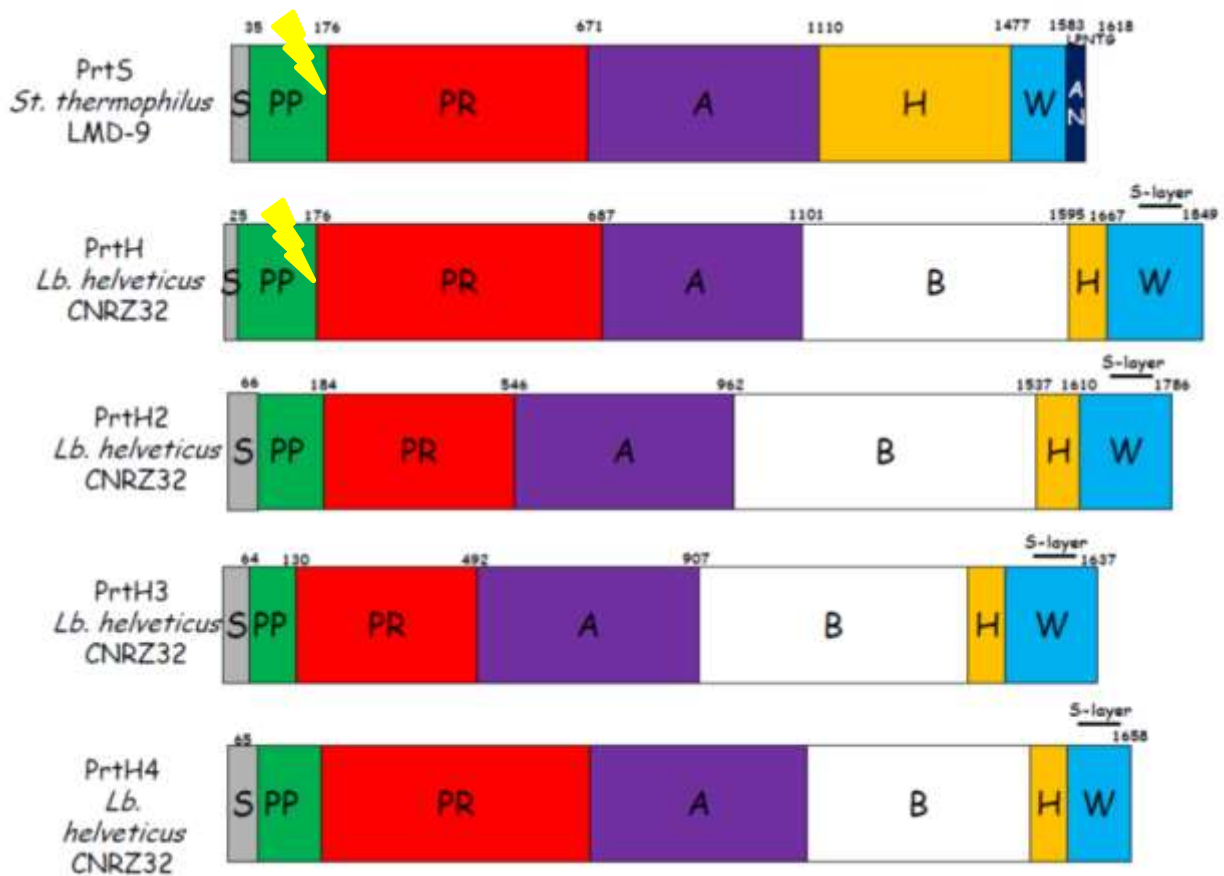


Figure 4 : Représentation schématique des domaines des protéases pariétales de *L. helveticus* et *S. thermophilus*. Les domaines ont été prédits par bioinformatique en fonction de leur homologie avec des domaines de protéases pariétales déjà étudiées. Les domaines représentés sont : la séquence signal (S), le prodomaine (PP), le domaine catalytique (PR), avec un domaine I (éclair jaune), le domaine A (A), le domaine B (B), le domaine hélicoïdal (H), le domaine W (W) et le domaine d'ancrage (AN). Selon l'hôte de la protéase pariétale, son domaine de fixation à la paroi varie. Ainsi, les protéases PrtH présentent un motif d'attachement de type S-layer retrouvé chez *L. helveticus* et PrtS de *S. thermophilus* possède un motif de type LPNTG. Les numéros réfèrent au dernier résidu d'acide aminé de chaque domaine déterminés dans de précédentes études.

Le prodomaine appelé domaine PP est localisé en aval du domaine S. Il permet de conserver la protéase sous sa forme immature ou inactive. Lorsque le propeptide est clivé, la protéase acquiert alors sa forme mature ou active. Ce mécanisme n'est pas encore bien défini mais deux possibilités sont envisagées. Soit une auto maturation de la protéase, comme cela a été démontré pour PrtB de *L. bulgaricus* en l'exprimant de façon hétérologue chez *Lc. lactis* (Germond et al., 2003), soit la maturation de la protéase est guidée par une protéine chaperonne de type peptidyl-prolyl isomerase aussi nommée maturase ou PrtM (Broadbent et al., 2011 ; Savijoki et al., 2006)

L'activité protéolytique est directement liée au domaine catalytique appelé domaine PR qui est situé en aval du domaine PP. C'est l'homologie de séquence du domaine PR des protéases pariétales de *L. helveticus* et *S. thermophilus* qui permet de les classer dans la famille des subtilisines. On y retrouve en particulier les trois acides aminés de la triade

catalytique : l'asparagine, l'histidine et la sérine. Le domaine I inséré dans le domaine PR (éclair jaune Figure 4) n'est pas retrouvé chez les protéases PrtH2, PrtH3 ni PrtH4 mais il est présent chez PrtS et PrtH, qui par homologie sont plus proches de PrtP de *Lc. lactis* où ce domaine a été défini pour la première fois. Le domaine I (Figure 4) est retrouvé chez la majorité des lactocépines et correspond à une insertion d'acides aminés typiquement retrouvée entre les sites actifs His et Ser de la triade catalytique. Chez la protéase PrtP de *Lc. Lactis*, il influencerait sur l'activité et la reconnaissance spécifique de substrat de la protéase (Bruinenberg et al., 1994).

Le domaine A est situé en aval du domaine PR. Il est principalement composé de brins β qui s'agenceraient en feuillets β pour former le cœur hydrophobe d'un domaine globulaire. La fonction de ce domaine n'a pas été déterminée pour PrtS et PrtH (Fernandez-Esplá et al., 2000 ; Siezen, 1999) mais chez la protéase PrtP de *Lc. lactis*, il a été mis en évidence que les résidus 747 et 748 du domaine A jouent un rôle dans la reconnaissance spécifique du substrat (Vos et al., 1991).

Chez la plupart des bactéries lactiques, le domaine A est suivi d'un domaine B comme c'est le cas des protéases de *L. helveticus*, *L. delbrueckii* ou *Lc. lactis*. Cependant, le domaine B n'est pas retrouvé chez PrtS de *S. thermophilus*. Ce domaine se replierait, tout comme le domaine A, en un cœur hydrophobe grâce à des feuillets β et pourrait avoir un rôle dans la stabilité du domaine catalytique de la protéase (Siezen, 1999).

Le domaine H est situé en aval du domaine A chez PrtS et du domaine B chez les protéases de *L. helveticus*. Il est composé essentiellement d'acides aminés initiateurs d'hélices α tels que l'alanine, la leucine, la tyrosine, la lysine et l'acide aspartique. La structure secondaire de ce domaine formerait une tige qui permettrait l'éloignement des domaines PR, A et B de la surface de la cellule.

Le type d'ancrage de la protéase à la paroi varie entre *L. helveticus* et *S. thermophilus*. Chez *L. helveticus*, les protéases sont attachées par des liaisons non-covalentes à la paroi au niveau du domaine W situé en aval du domaine H et qui constitue l'extrémité C-terminale de la protéase. Le domaine W est commun aux protéines ancrées à la paroi chez les bactéries à coloration Gram positive et fait office d'espaceur pour passer l'épaisseur du peptidoglycane. Ce domaine est riche en résidus Pro-Gly d'une part et Ser-Thr d'autre part (respectivement 16 et 20%) (Fischetti et al., 1990). Chez *L. helveticus*, l'attachement des protéases à la paroi est dû à la présence d'un motif de type S-layer (pfam 03217). Les protéines S-layers sont retrouvées en fortes quantités sur les parois de différentes espèces bactériennes dont

L. helveticus. Elles sont attachées à la paroi et entre elles par des liaisons fortes, mais non-covalentes, grâce aux motifs S-layer (Sleytr et Beveridge, 1999). Ces motifs ont été assignés à un domaine protéique pfam03217 (Boot et al., 1995) et sont aussi retrouvés chez d'autres protéines pariétales de lactobacilles comme les protéases de paroi ou d'autres protéines appelées « protéines associées aux S-layer ». Cependant, ce domaine ne différencie pas les protéines formant la carapace de protéines à proprement dites S-layer et les protéines associées aux S-layer (Johnson et al., 2013). Ces interactions protéiques rendent encore plus complexes l'environnement physicochimique autour de cette carapace de protéines S-layer. Chez *S. thermophilus*, comme chez la majorité des protéases des bactéries lactiques, le système d'ancrage se décompose en deux domaines bien distincts situés en aval du domaine H. On retrouve le domaine W, servant d'espaceur, suivi du domaine AN, qui permet l'ancrage de la protéase à la paroi (Fernandez-Espla et al., 2000). Ce domaine renferme un motif de type LPNTG reconnu par une sortase (SrtA) au niveau de la paroi qui lie de façon covalente la protéase au peptidoglycane. Plus précisément, la sortase possède une activité transpeptidasique qui attache le résidu thréonine du motif LPNTG par liaison amide au pentapeptide d'un lipide II précurseur du peptidoglycane (cf partie sécrétion et ancrage des protéines pariétales p57).

III.B *PrtS* chez *S. thermophilus*

Dans les collections, les souches de *S. thermophilus* peuvent être séparées en deux groupes selon qu'elles soient protéolytiques ou non-protéolytiques (Delorme et al., 2010 ; Shahbal et al., 1991). L'absence de protéolyse rencontrée chez certaines souches peut s'expliquer soit par l'absence du gène *prtS* dans le génome ou sa non-expression (Galia et al., 2009). Ainsi, parmi les 6 souches dont le génome a été séquencé, les souches LMG18311 (Bolotin et al., 2004), CNRZ1066 (Bolotin et al., 2004) et ND03 (Sun et al., 2011) ne possèdent pas le gène *prtS*, contrairement aux souches LMD-9, JIM8232 et MNZLW002. D'autre part, parmi les souches protéolytiques de *S. thermophilus*, l'activité protéolytique peut varier selon ces souches, cette variation pouvant résulter d'une régulation de l'expression du gène *prtS* différente (Galia, 2011 ; Galia et al., 2009). Parmi les souches fortement protéolytiques, la souche 4F44 (génome non séquencé) se distingue par la présence de deux formes de la protéase PrtS : une forme ancrée à la paroi et une forme libérée dans le milieu. En effet, une activité de PrtS a été retrouvée à ces deux localisations et a permis d'estimer que 60% des protéases étaient ancrées et 40% libérées. Une hypothèse serait que l'activité

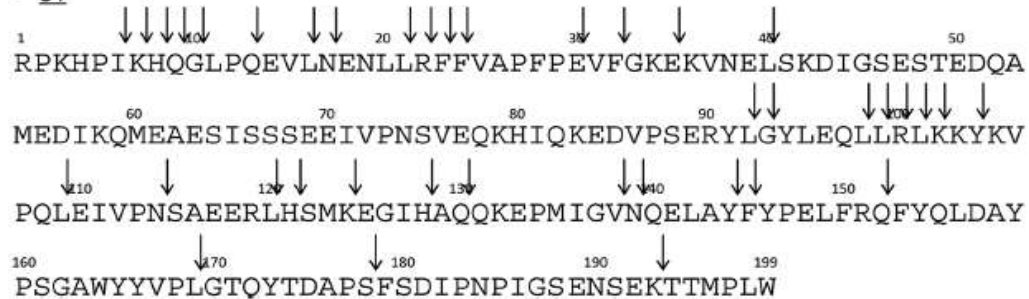
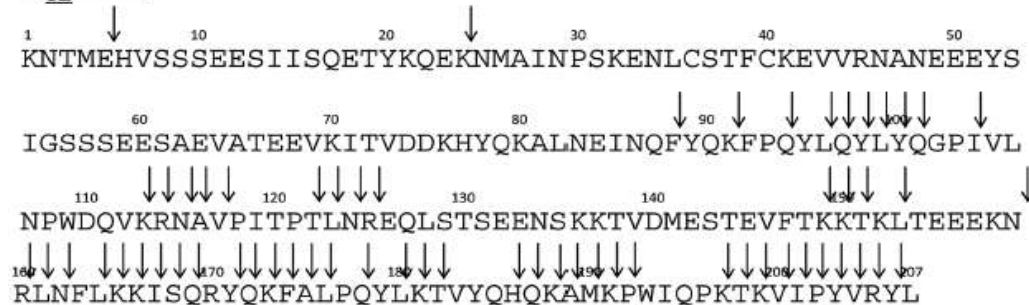
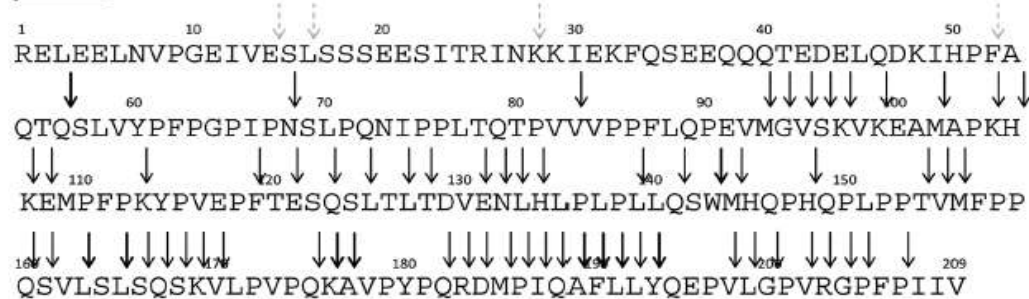
transpeptidasique de la sortase SrtA qui permet l'ancrage de la protéase à la paroi par le motif LPNTG serait déficiente (Chang et al., 2012). La représentativité des souches possédant une activité protéolytique de surface dans les collections a évolué au cours de ces 20 dernières années. En 1993, Shahbal et al. ont recensé 3 souches, parmi une collection de 97 souches de *S. thermophilus* de la collection CNRZ (INRA), possédant une activité protéolytique. Plus récemment, parmi les nouvelles souches qui ont incrémenté les collections, 30 souches ont été identifiées comme possédant le gène *prtS* sur 55 souches testées (Galia et al., 2009 (23/30) et Delorme et al., 2010 (8/27)). L'émergence de souches protéolytiques dans les collections a été favorisée par les industriels, en raison de la faculté de ces souches à « se développer plus rapidement dans le lait ». Ainsi, une bonne expression de la protéase PrtS est maintenant un critère de sélection important puisqu'il a été démontré que l'expression de *prtS* par les souches de *S. thermophilus* favorise l'acidification rapide du lait (Dandoy et al., 2011 ; Galia et al., 2009).

La protéase PrtS a déjà été bien étudiée chez *S. thermophilus* et la première séquence du gène *prtS* publiée en 2000 par Fernandez-Espla et ses collaborateurs. Elle a été classée dans la famille des subtilisines d'après son site catalytique bien qu'elle comprenne sept domaines (S, PP, PR, A, H, W et AN) (Figure 4). La protéase PrtS est synthétisée sous la forme d'une pré-pro-protéine de 1585 résidus d'acides aminés, qui une fois sous forme mature et ancrée à la paroi, compte 1411 résidus. En effet, lors de la sécrétion de la pré-pro-protéase, le peptide signal (35 résidus d'acides aminés) situé à l'extrémité N-terminale est clivé par une peptidase du système Sec, libérant ainsi la pro-protéase. Cette pro-protéine serait ensuite attachée de façon covalente au peptidoglycane par la thréonine (T) du site de fixation LPNTG libérant ainsi 31 résidus du domaine AN situé du côté C-terminal. Enfin, la protéase serait maturée par le clivage de son propeptide PP en N-terminal.

Chez la souche LMD-9, le gène *prtS* code une pré-pro-protéase présentant 99% d'identités avec la séquence protéique de celle de la souche CNRZ385 publiée par Fernandez-Espla, mais de taille légèrement plus importante (1618 résidus d'acides aminés) (Chang et al., 2012 ; Delorme et al., 2010 ; Goh et al., 2011). La différence de 32 résidus d'acides aminés entre les deux formes de PrtS correspond à une duplication imparfaite dans le prodomaine PP (Chang et al., 2012 ; Delorme et al., 2010). Ainsi, une fois sous forme mature et ancrée à la paroi, les deux protéases comptent le même nombre de résidus d'acides aminés soit 1411. Cette duplication imparfaite est retrouvée chez les trois souches dont le génome a été intégralement séquencé (LMD-9, JIM8232 et MNZLW002). A l'inverse, les protéases PrtS des souches CNRZ385 et 4F44 ne possèdent pas cette duplication dans leur prodomaine et

leurs séquences sont identiques à plus de 98 % avec la séquence de la protéase PrtS retrouvée chez *Streptococcus suis* (Delorme et al., 2010). Delorme et al, (2010) ont suggéré, d'après la distribution du gène *prtS* dans les collections de souches de *S. thermophilus* et par comparaison des séquences chromosomiques situées en amont et en aval de *prtS*, que les souches de *S. thermophilus* auraient acquis ce gène par transfert horizontal à partir de *S. suis*. La duplication de 32 acides aminés du prodomaine chez certaines souches de *S. thermophilus* est interprétée comme le résultat d'une adaptation au milieu lait. Ceci aurait permis d'optimiser le rôle de chaperonne du prodomaine PP et d'améliorer le repliement de la protéase dans ce nouveau milieu (Delorme et al., 2010).

Au niveau biochimique, la protéase PrtS de *S. thermophilus* CNRZ385 a été purifiée et caractérisée (Fernandez-Espla et al., 2000). Il a été noté une forte activité en présence d'ions calcium (Ca^{2+}) et une capacité à hydrolyser le substrat synthétique acetyl-Ala-Ala-Pro-Phe-paranitroanilide de façon optimale à 37°C et à pH 7,5. Dans cette même étude, l'hydrolyse du fragment (1-23) de la caséine α_{s1} par PrtS a montré une coupure préférentielle des liaisons Leu₁₆ - Asn₁₇ et Asn₁₇ - Glu₁₈ et dans une moindre mesure des liaisons His₈ - Gln₉ et Gln₉ - Gly₁₀. Cette spécificité de coupure a aussi été retrouvée par Miclo et al, (2012) chez d'autres souches de *S. thermophilus*. Dans cette étude, des hydrolyses *in vitro* des caséines β , α_{s1} et α_{s2} ont été réalisées avec des culots cellulaires de souches de *S. thermophilus* exprimant un potentiel protéolytique plus ou moins fort. Ces souches possèdent toutes le même allèle du gène *prtS* à l'exception d'une, la souche 4F44, précédemment décrite. Il a été observé que les souches protéolytiques de *S. thermophilus* étaient capables d'hydrolyser les caséines du lait et préférentiellement la caséine β (β -CN). Les auteurs ayant observé sur la portion 1-23 de la caséine α_{s1} , les mêmes coupures que celles observées avec la forme purifiée de PrtS, ils ont conclu que la protéolyse observée dans leurs conditions expérimentales résultait majoritairement de l'activité de PrtS. Sur cette base, l'analyse des sites de coupure sur les caséines a révélé deux types d'activités protéasiques: (i) PrtS couperait préférentiellement les liaisons peptidiques après les résidus basiques (Arg, Lys et His) ce qui correspondrait à une activité de type trypsique (Arg, Lys), élargie à l'histidine ;(ii) PrtS couperait après les résidus hydrophobes (Leu, Phe, Met, Tyr), ce qui se rapprocherait d'une activité chymotrypsique. Enfin, la glutamine serait aussi ciblée par PrtS. Les différents sites de coupure de PrtS sur les 3 caséines (β , α_{s1} et α_{s2}) sont représentés dans la Figure 5 (Miclo et al., 2012). Cette étude a également montré que certains des peptides libérés par l'hydrolyse *in vitro* des caséines étaient décrits dans la littérature comme peptides bioactifs. C'est le cas pour 13 peptides issus de la β -CN, cinq de l' α_{s2} -CN et deux de l' α_{s1} -CN, possédant des activités inhibitrices de



Enfin, bien que l'activité et la spécificité de coupure de PrtS sur les caséines bovines aient déjà été bien caractérisées, il reste toujours des interrogations quant à son activité protéolytique dans les conditions physicochimiques du fromage ou du yaourt et sur des micelles de caséines intactes. Ces conditions d'hydrolyse et la qualité du substrat pourraient influencer sur l'activité et la spécificité de PrtS et ainsi générer des peptides techno-fonctionnels

et bioactifs différents de ceux déjà observés lors des hydrolyses *in vitro* à des conditions de température et de pH optimales pour la protéase.

III.C Les protéases *Prth* chez *L. helveticus*

La plupart des souches de *L. helveticus* expriment des protéases pariétales. Ces protéases sont responsables de la production de peptides techno-fonctionnels qui confèrent des propriétés structurantes (pouvoir filant) et organoleptiques aux fromages (diminution de l'amertume, accélération du développement des saveurs) (Ardö et Pettersson, 1988 ; Bartels et al., 1987a, 1987b ; Drake et al., 1996 ; Olson et al., 1996 ; Oommen et al., 2002). Ainsi, la souche *L. helveticus* CNRZ32 est utilisée dans l'industrie fromagère pour réduire l'amertume car elle hydrolyse les peptides amers (β -CN (f193-209) et α_{s1} -CN (f1-9)) (Lemieux et Simard, 1992 ; Soeryapranata et al., 2007). D'autre part, des peptides bioactifs ayant une activité spécifique chez le consommateur peuvent aussi être générés (Korhonen, 2009). Par exemple, les peptides bioactifs issus des protéines du lait (Gobbetti et al., 2010 ; Hayes et al., 2007 ; Laffineur et al., 1996 ; LeBlanc et al., 2002) peuvent inhiber l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE), être immunomodulateurs ou antimicrobiens (De LeBlanc et al., 2005 ; Matar et al., 2001 ; Minervini et al., 2003 ; Yamamoto et al., 1994 ; Griffiths et Tellez, 2013). La particularité de *L. helveticus* est de pouvoir posséder jusqu'à quatre gènes de protéases pariétales dans son génome et la variabilité du nombre de gènes de protéases selon les souches permettrait d'expliquer, en partie, les différences de protéolyse rencontrées (Broadbent et al., 2011 ; Sadat-Mekmene et al., 2011b, 2013 ; Zevaco et Gripon, 1988). Cependant, il est encore aujourd'hui difficile de prédire les caractéristiques protéolytiques d'une souche en se basant uniquement sur sa panoplie de protéases pariétales, ce qui nécessite donc d'approfondir nos connaissances sur les caractéristiques de chacune des protéases de paroi de *L. helveticus* voire du système protéolytique de cette espèce.

Les quatre gènes homologues codant les quatre protéases pariétales de *L. helveticus* ont été recherchés par PCR chez 38 souches de cette espèce. De plus, les systèmes protéolytiques de 37 des 38 souches ont été comparés à celui de la souche CNRZ32 par hybridation de chacun des 37 génomes sur une puce ADN élaborée à partir des séquences codantes de la souche CNRZ32 (Broadbent et al., 2011). Cette étude a révélé que le gène ubiquitaire dans le panel de souches testées était *prth3*. En effet, il a été retrouvé seul ou accompagné de gènes codant les autres protéases dans 30/38 souches étudiées. De plus, les souches ne présentant qu'un seul gène de protéase possèdent dans quasiment tous les cas *prth3*, comme par exemple la souche ITG LH77 qui est très utilisée dans l'industrie fromagère. Différentes

études ont été menées pour définir les activités et les spécificités de coupure des protéases pariétales de *L. helveticus*. Les protéases ont été étudiées selon deux méthodes : à l'état natif, c'est-à-dire en utilisant la cellule bactérienne comme support des protéases, ou après avoir été extraites de la paroi. Deux types d'extractions ont été réalisées : non purifiées *i.e.* directement sur les fractions de protéines extracellulaires contenant les protéases ou après pré-purification (Sadat-Mekmene et al., 2011b, 2011a). Cependant, le nombre de protéases pariétales étant alors inconnu chez ces souches, la description des résultats d'hydrolyse des caséines *in vitro* (caséines bovines purifiées) ou *in situ* (dans le lait bovin) est assez ambiguë. Toutefois, il ressort de ces études que l'activité protéolytique au niveau de la paroi des *L. helveticus* est fortement influencée par le milieu de culture utilisé avant la réalisation des tests d'hydrolyse. Ainsi, le lait est le milieu dans lequel l'activité des protéases est la plus importante comparé au milieu MRS ou à un milieu chimiquement défini (MCD) (Gilbert et al., 1997 ; Hebert et al., 2000, 2002 ; Jensen et al., 2009 ; Sadat-Mekmene et al., 2011b ; Smeianov et al., 2007). Ainsi, Sadat-Mekmene et al, (Sadat-Mekmene et al., 2011b) ont montré que l'activité protéolytique détectée après croissance de *L. helveticus* en milieu lait est 9 à 12 fois supérieure à celle détectée après croissance de la bactérie en milieu MRS. Cette variation d'activité concerne surtout le taux d'hydrolyse du substrat plutôt que le type de peptides générés (Ezzat et al., 1985 ; Laloi et al., 1991). Comparé au MRS, le lait est un milieu pauvre en peptides libres. La différence d'activité protéolytique observée en fonction du milieu de culture suggère ainsi une régulation du système protéolytique par le taux d'acides aminés ou de peptides présents dans le milieu. A ce jour, il a été mis en évidence que le dipeptide Leu-Pro, lorsqu'il était présent dans le milieu de culture, diminuait de 25% l'activité des protéases de paroi de *L. helveticus* (Hebert et al., 2000). Smeianov et al, (2007) ont aussi observé une augmentation du taux de transcription des gènes *prtH* et *prtH2* (*prtH3* selon Broadbent et al, 2011) au cours d'une croissance en milieu lait par rapport à une croissance en MRS. Cette différence d'activité selon la concentration en acides aminés libres et en peptides dans le milieu de culture a été également observée chez d'autres lactobacilles et bactéries lactiques (Gilbert et al., 1997).

D'après les résultats obtenus, les protéases pariétales de *L. helveticus* semblent avoir une spécificité de coupure très large qui implique des résidus aliphatiques (Leu, Val, Ala, et Ile), dicarboxyliques (Glu et Gln), basiques (Lys et Arg), aromatiques (Phe, Tyr et Trp), hydroxylés (Ser et Thr), soufrés (Met) et hétérocyclique (Pro). Cependant, les fragments peptidiques générés par l'hydrolyse diffèrent selon la souche, le type de caséine (α_{s1} ou β) ou selon l'état de purification de ces dernières. En effet, dans le lait, les caséines interagissent

entre-elles en formant des complexes qui rendent inaccessibles certains sites de coupure atteignables par les protéases lorsque les caséines sont purifiées (Sadat-Mekmene et al., 2011b, 2011a).

En ce qui concerne la caséine β , la plupart des souches testées hydrolysent la liaison Phe₁₉₀-Leu₁₉₁ et la liaison Glu₁₇₅ - Lys₁₇₆ alors que la majorité des autres sites de coupure sont dépendants de la souche (Hebert et al., 2002 ; Sadat-Mekmene et al., 2011b) (Figure 6). De plus, Sadat-Mekmene et al, (2011) ont démontré que lorsqu'une souche exprime une autre protéase en plus de PrtH2 (PrtH3 selon Broadbent et al, 2011) sur sa paroi, le taux d'hydrolyse des caséines β est augmenté, passant de 22-30% à 41-49% quand les deux protéases sont exprimées (Sadat-Mekmene et al, 2011). Ainsi, PrtH2 aurait une plus forte affinité pour la caséine β que pour l' α_{s1} et la présence d'une deuxième protéase (PrtH dans Sadat-Mekmene et al, 2011), probablement plus affine pour la caséine α_{s1} ferait basculer ce taux d'hydrolyse.

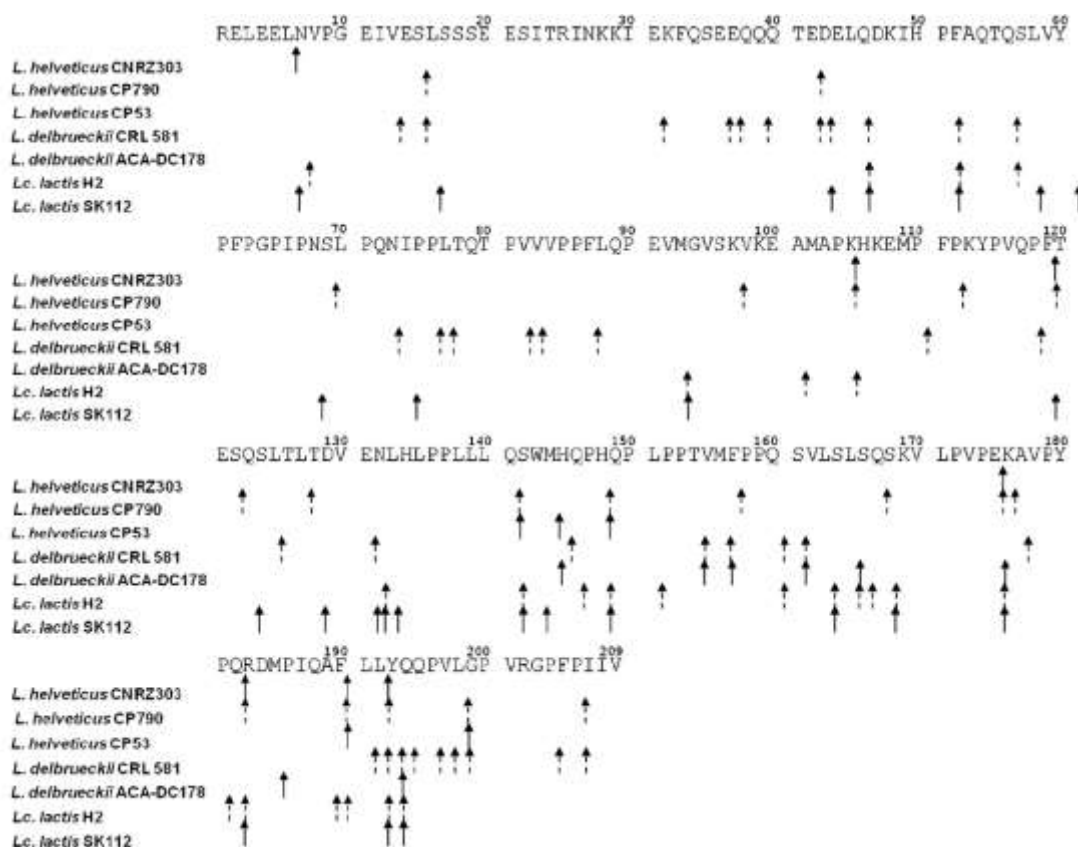


Figure 6 : Représentation des sites spécifiques de clivage des systèmes protéolytiques de paroi des souches de *L. helveticus* CNRZ 303 (Zevaco et Gripon, 1988), *L. helveticus* CP790 (Yamamoto et al., 1993), *L. helveticus* CP53 (Ono et al., 1997), *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581 (Hebert et al., 2008), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC178 (Tsakalidou et al., 1999) et *Lc. lactis* subsp. *cremoris* H2 (PI-type) et SK112 (PIII-type) (Reid et al., 1991) le long de la séquence de la caséine β (Sadat-Mekmene et al., 2011a).

L'hydrolyse de la caséine α_{s1} par les protéases de paroi de *L. helveticus* varie également en fonction des souches de *L. helveticus* et la plupart sont peu affines pour la caséine α_{s1} (Sadat-Mekmene et al., 2011a). Cependant, certains sites semblent spécifiques de PrtH (Ile₆-Lys₇, Gln₉-Gly₁₀ and Leu₁₄₂-Ala₁₄₃) (Figure 7).

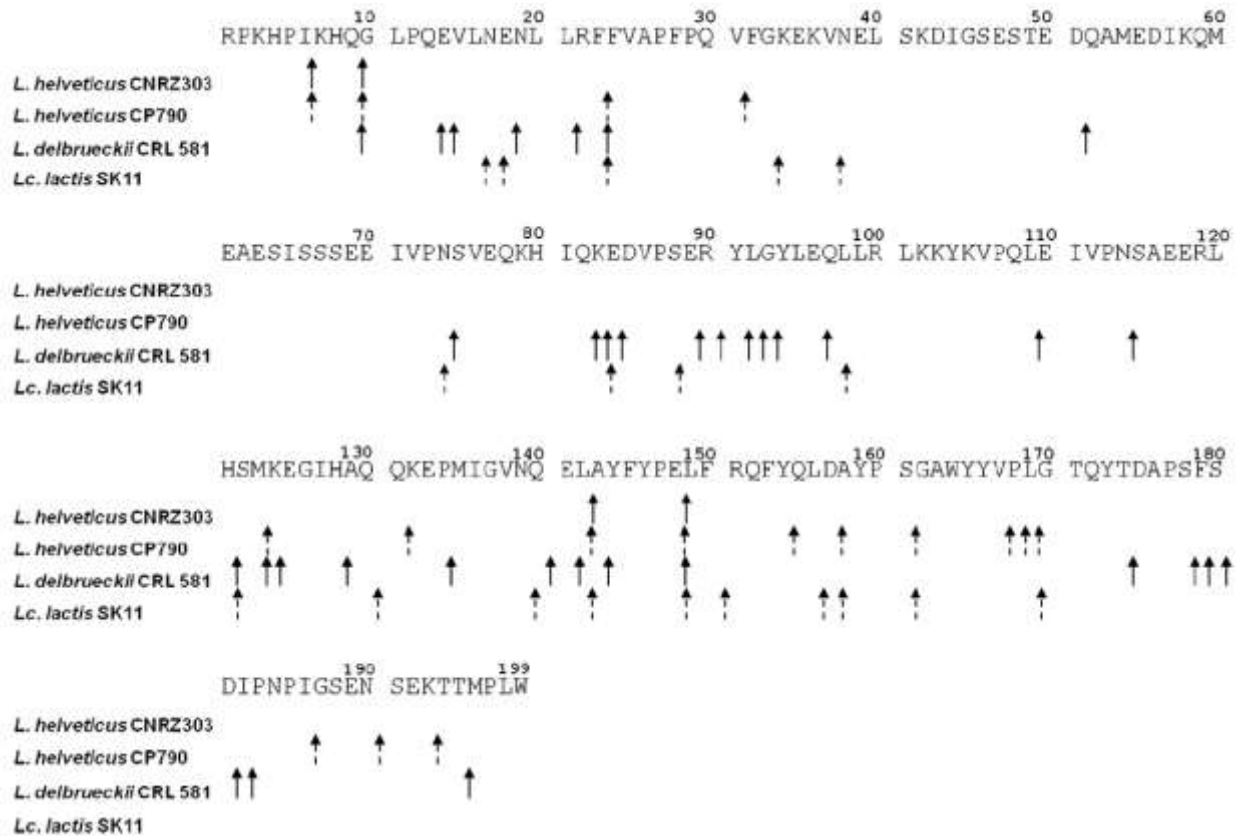


Figure 7 : Représentation des sites spécifiques de clivage des systèmes protéolytiques de paroi des souches de *L. helveticus* CNRZ 303 (Zevaco et Gripon, 1988), *L. helveticus* CP790 (Yamamoto et al., 1993), *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581 (Hebert et al., 2008), et *Lc. lactis* subsp. *cremoris* SK11 (Reid et al., 1991) le long de la séquence de la caséine α_{s1} (Sadat-Mekmene et al., 2011a).

D'autre part, il est aussi habituel d'étudier l'hydrolyse du fragment (1-23) de la caséine α_{s1} car ce fragment est connu pour être la première cible de la protéase de *Lc. lactis* au cours de la phase d'affinage des fromages à pâte molle (Exterkate, 1995 ; Visser, 1993). Ce fragment a aussi été utilisé pour étudier la diversité et la spécificité de protéases de différentes souches de *L. helveticus* par Oberg et al, (2002) (Figure 8).

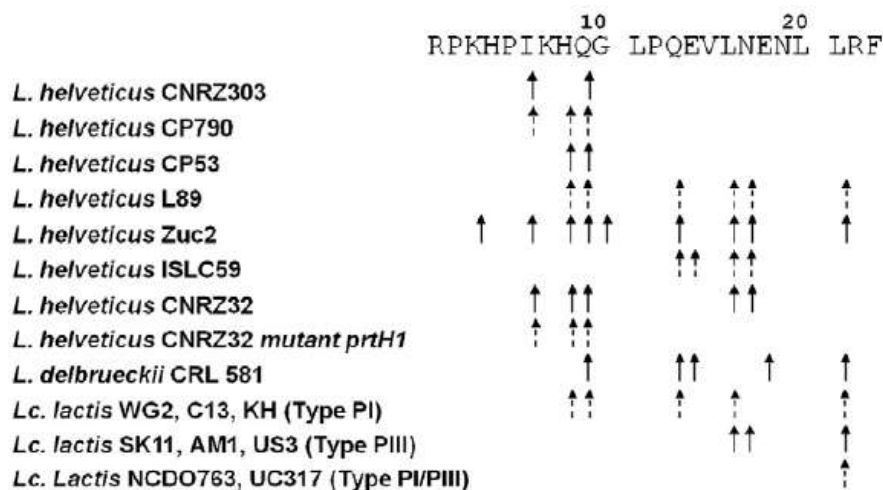


Figure 8 : Spécificité de coupure des systèmes protéolytiques de paroi de *L. helveticus* CNRZ 303 (Zevaco et Gripon, 1988), *L. helveticus* CP790 and CP53 (Ono et al., 1997), *L. helveticus* L89 (Martin-Hernandez et al., 1994), *L. helveticus* Zuc2 (Scolari et al., 2006), *L. helveticus* ISLC59 (Caira et al., 2003), *L. helveticus* CNRZ32 (Pederson et al., 1999), *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581 (Hebert et al., 2008) et *Lc. lactis* subsp. *cremoris* WG2 et SK11 (Kunji et al., 1996) sur le fragment (1-23) de la caséine α_{s1} (d'après Sadat-Mekmene et al., 2011a).

L'hydrolyse des caséines α_{s2} et κ par les protéases de *L. helveticus* a été très peu étudiée car ces caséines sont difficiles à purifier (pour les caséines α_{s2}) et peu hydrolysées (Sadat-Mekmene et al., 2011a).

En conclusion, cette très large spécificité de coupure lors de l'hydrolyse des caséines par les protéases de paroi de *L. helveticus* et la difficulté à purifier chaque protéase n'a pas permis, jusqu'ici, de définir une activité et une spécificité de coupure propre à chacune de ces protéases.

III.D Homologie entres les protéases de paroi

Les séquences des quatre protéases de *L. helveticus* CNRZ32 sont disponibles depuis peu (Broadbent et al., 2011). La comparaison de la structure primaire de chacune de ces protéases PrtH avec celle de protéases pariétales mieux caractérisées peut permettre de faire des hypothèses plus précises quant à la spécificité de chacune d'entre-elles.

Un alignement global, grâce à ClustalW2 (Sievers et al., 2011), du domaine catalytique des quatre protéases recensées et séquencées chez *L. helveticus* et de PrtS de *S. thermophilus*,

Synthèse bibliographique

a été réalisé a été réalisé. Les pourcentages d'identité sont présentés dans le Tableau 3. et l'alignement de séquences dont ils sont issus est représenté Figure 9 Le domaine catalytique, à l'origine du classement de ces protéases dans la famille des subtilisines, est assez peu conservé au sein même des protéases de *L. helveticus* affichant une différence notable entre PrtH, PrtH4 et le groupe PrtH2-PrtH3. Enfin, le domaine catalytique de PrtS semble assez éloigné de celui des protéases de *L. helveticus*.

Tableau 3 : Matrice d'identité des domaines PR (%) des quatre protéases de paroi de *L. helveticus* et de PrtS de *S. thermophilus* par ClustalW2

	PrtH	PrtS	PrtH4	PrtH2	PrtH3
PrtH	100	35,68	36,59	38,94	38,1
PrtS	35,68	100	36,19	36,84	36,84
PrtH4	36,59	36,19	100	67,31	68,14
PrtH2	38,94	36,84	67,31	100	79,83
PrtH3	38,1	36,84	68,14	79,83	100

PrtH2	NNQDHVKGNVQSAND-QGYRGEHTVVAVIDSGVDVHHKDFLTMPKN-PKLTADQMRLIK	58
PrtH3	NNQDHVKGNVQDAWN-QGYSGEHMAVAVIDSGIDVDHKKDFQTMPKD-PKLTADMKKLLK	58
PrtH4	NQADHVKGNVQSAND-QGYRGGGTVVAVIDSGADPTHKDFKTMPEP-PKLSEDDMQAKIA	58
PrtH	DSSADNMNVSTVWNNYKYKGEGTVVSIIIDTGDPNHKLRLSDSKVKLTDKVNAFTK	60
PrtS	NIDSNTIITVPKVD-SGYKGEGTVVAIIDSGLDVDHDLHISDLSTAKYKSEKIEAAK	59
	: . * . * : * : * : * : * : * . : . * . :	
PrtH2	RLG---YGRYVNEKFFAYNYVDNENDHLK---APNGEPHGQHVSGIIAADGHDPGDNT	111
PrtH3	ELG---YGRYVNEKIPYAYNYVDNENEHLK---GPDDEPHGQHVSGTIAADGHDPGDKE	111
PrtH4	KQG---YGRYVNEKFFPYVNYADRDNDYIISDDTNANDSPHGQHVSGIIAADGKPDGNKE	115
PrtH	ESG---YGRYFTDKVPYGHNYSDN-NDNIID---DNPSEQHGMHVAGIVAANGTADSVN-	112
PrtS	EVAGISYGEWFNDKVVFGYNYVDVNTVLKEE---DKRSHGMHVTSIATGNPTQPVAGQ	114
	. . * : . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
PrtH2	YVVGVAPEAQLMQLKVFQDNS----TSLDMAKEICDAVNLGADVNMISLGGGV-SAADL	165
PrtH3	YVVGVAPEAQLLHLKVFQDIT----TSLDLAKEIYDAVNLGADVQMISLGGGV-SAADL	165
PrtH4	YVVGVAPEAQLMQLRVFGQFSD---EKTDDVAKAIYDATNLGADVQMISLGGGV-ADQQL	171
PrtH	SVVGVAPEAQLLAMKAFSNSDSSASTDSTSIIGAIDDSAKLGADVNMISLGSVS-GEQTE	171
PrtS	LMYGVAPAEQVMFMRVFSDLKAT--TGAALYVKAIEDAVKLGADSINLSLGGANGSVNM	172
	: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
PrtH2	NIQDQRAVQYAVDHGVVVVISAANNNGNA-----	193
PrtH3	NNADQRAVQYVIDHGVIVSISASNNNGNS-----	193
PrtH4	TNIEQKAVQYVIDHGVFVSIASNNNGNS-----	199
PrtH	DDPEVAVERATKKGTAAVISAGNSGTNSSEIEGVNKAYYGNPDMETLGNPGTARSATTV	231
PrtS	NENVTAIEAARRAGVSVVIAAGNDGTFG---SGHSNPSADYPDYGLVGAPSTARDAISV	229
	* : * * . * : * : * : * : *	
PrtH2	ASVDNPTH-----LTDLDNYQAGGN	213
PrtH3	ASVDNPSK-----ITDLDDEYFGE	213
PrtH4	ASVDNPSK-----VKDQG-YQSGSQ	218
PrtH	ASAENTKATTIGVTIISADGKTTIAGPEATQLSEGTDRAFFNDKKFYVVKDKNGNLGTGS	291
PrtS	ASYNNTTVGSKVINIIGLENNADLNYGKSSFDNPEKSPVPFIEG---KEYEYVYAGITGQ	285
	** : * . *	
PrtH2	AGNYNPFSSS-IVANP-----GAA-----	231
PrtH3	RGNYLPFSSS-IVANP-----GAA-----	231
PrtH4	AGNYEPLNLS-IVANP-----GVS-----	236
PrtH	AKQYISAVKG-KIAIVKRGELTFTDKQKYAQEAGAAGLIIVNNKAGDITGMLLNAGFPTA	350
PrtS	ASDFDGLDLTGKLALIKRGITISFSEKIANATAAGAVGVVIFNSRPDEAN---VSMQLDDT	342
	: : . : *	
PrtH2	-----RSAITVAAETSGTGKSDMAFFSSWGPLPDTLKPQDVS	269
PrtH3	-----KGAITVAAENSGLGKSDMASFSSWGPLPDYTLKPDIS	269
PrtH4	-----KNALTVAAEISDTGDLSDMAYFSSWGPAQDYTLKPDLS	274
PrtH	GLSATSGEKLKLVYEAHPDEALKVSIIVVQALNNSARQTDLMSDFTSYGPTSSLAFLKPDIS	410
PrtS	ATAIPSVFIFLEFGEALAANSYKIAFNNETDIRPNEAGLLSDFSSWGLSADGELKPDLA	402
	: : : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
PrtH2	APGYDVIISTANGNSYTMSTGSMASPFVAGAAALVRERLLKTN-----PKLKGAAALVE	322
PrtH3	APGVDVISTANDNGYTTMSGTSMAGPFVAGAAALVKQRLKTN-----PELKGAAALVE	322
PrtH4	APGYQVSTVNHDQYQTMSTGSMAGPFAAASALVIQRLKQTN-----PELKGAAALVE	327
PrtH	APGGHIWSTQNNNGYTNMSGTSMASPFVAGAAALVKQRLKQTN-----PELKGAAALVE	470
PrtS	APGGAIYAAINDNDYANMQGTSMASPHVAGAAALVKQYLQATY-----PKSPQEIET	455
	*** : : * : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
PrtH2	AIKALLTNTADPQVQNGYN-TLVSPRRQGAGQINVGAATKS	362
PrtH3	AVKALLMNTAVPQTQKGFQ-TPVSPRRQGSGQIDVGAATKS	362
PrtH4	AAKALLMNTAKPQTQLGYT-TPVSPRRQGAGQIDVGAATAT	367
PrtH	FIKTLEMNTASIQPDIHDNVIVSPRRQGAGFINANATIQA	511
PrtS	LVKHLMLSTAKAHVNKETT-AYTSPRRQGAGIIDTAAAI	495
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	

Figure 9 : Alignement des domaines PR des quatre protéases de paroi de *L. helveticus* et de PrtS de *S. thermophilus* par ClustalW2. « * » tous les résidus alignés sont identiques ; « : » et « . » tous les résidus alignés sont similaires.

Outre leur appartenance au sous-groupe des lactocépines de la famille des subtilisines qui leur confère une certaine homologie au niveau de leur domaine catalytique, les alignements des séquences globales (du peptide signal jusqu'au domaine d'ancrage) des protéases de *S. thermophilus* et de *L. helveticus* révèlent une faible identité (Tableau 4). Les protéases de nos modèles d'étude comprenant les 4 PrtH de *L. helveticus* CIRM-BIA 103 et PrtS de *S. thermophilus* LMD-9 ont donc été alignées via ClustalW2 avec d'autres protéases pariétales de bactéries lactiques. Chez *L. helveticus*, la plus forte identité est de 61,89% entre les protéases PrtH2 et PrtH3 qui sont toutes deux assez proches de PrtH4, avec respectivement 53,05 et 54,25% d'identité. La séquence de PrtH est plus éloignée des 3 autres protéases de *L. helveticus* (moins de 30% d'identité). Cette hétérogénéité entre les protéases a déjà été soulignée dans les travaux de Broadent et al (2011). Enfin, les alignements des protéases PrtH3 et PrtH4 ont révélé de légères variations entre les différentes souches de *L. helveticus*. Ainsi, la protéase PrtH3 présente chez la souche CNRZ32 CIRM-BIA 103 est identique à 99,33% avec celle de la souche LH77 CIRM-BIA 99, la différence portant seulement sur 11 substitutions d'acides aminés hors du domaine catalytique qui, lui, reste identique. La protéase PrtH4 présente chez la souche CNRZ32 CIRM-BIA 103 est identique à 98,85% avec celle de la souche R0052. Cette dernière présente une insertion de 9 résidus d'acides aminés dans le domaine W et 14 substitutions d'acides aminés dont trois sont localisées dans le domaine catalytique et deux dans le domaine A. Cependant, les trois substitutions retrouvées dans le domaine catalytique sont localisées en dehors des régions conservées des peptidases S8 (cd07475), minimisant les risques d'inactivité de la protéase.

L'arbre phylogénétique (Figure 10) basé sur l'alignement des protéases, et dont la robustesse a été testée par la méthode de bootstrap, divise ces protéases en trois sous-groupes composés de PrtH3, PrtH4, PrtH2 et PrtR pour le premier, PrtH, PrtJ, PrtP et PrtB pour le second et enfin PrtS pour le dernier. Ces trois groupes de protéases pourraient correspondre à une activité et une spécificité de coupure différentes. Cependant, le pourcentage d'identité entre les protéases de chacun de ces groupes est faible mis à part entre les protéases PrtH2 et PrtH3, les protéases PrtH3 des 2 souches de *L. helveticus* CNRZ32 CIRM-BIA 103 et LH77 CIRM-BIA 99 et les protéases PrtH4 de ces 2 souches. De plus, bien que PrtR partage 38% d'identité avec PrtH4, ceci n'est pas suffisant pour pouvoir comparer leurs spécificités de coupure des caséines. Seule PrtP et PrtH, possédant 45% d'identités, pourraient avoir des activités et spécificités comparables. Cependant, cette possibilité a déjà été réfutée (Pederson et al., 1999 ; Sadat-Mekmene et al., 2011a). Enfin, PrtS, issue de la famille des Streptocoques,

Synthèse bibliographique

est très différente des autres protéases de *Lactobacilles* et *Lactocoques* déjà étudiées et dont les séquences ont été utilisées dans cet alignement.

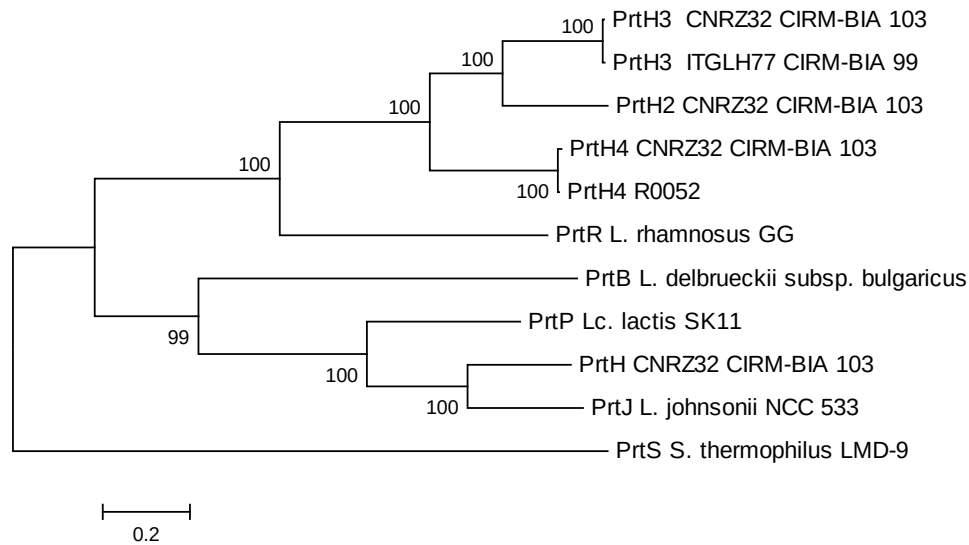


Figure 10 : Arbre phylogénétique construit avec le logiciel MEGA6 selon la méthode du maximum de ressemblance et d'après l'alignement des protéases pariétales de *L. helveticus* CIRM-BIA 103, ITGLH77 CIRM-BIA 99 et R0052, PrtS de *S. thermophilus* LMD-9, PrtR de *L. rhamnosus* GG, PrtJ *L. johnsonii* NCC 533, PrtB de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842 et PrtP de *Lc. Lactis* SK11 par ClustalW2. La robustesse de l'arbre phylogénétique a été testée par la méthode du bootstrap

En conclusion, les protéases de *S. thermophilus* et *L. helveticus*, bien qu'elles soient toutes deux classées dans la famille des subtilisines, partagent peu de similitudes tant au niveau de leurs séquences que par leur domaines d'attachement à la paroi. Cependant, d'après leurs différents domaines protéiques, elles semblent toutes être présentes au niveau de la paroi et interagir directement avec le milieu extracellulaire. Cette hypothèse est la base d'une de nos stratégies d'étude des protéases de *L. helveticus* qui consiste à exprimer de façon hétérologue chacune des protéases de *L. helveticus* CNRZ32 CIRM-BIA 103 chez *S. thermophilus* LMD-9.

Synthèse bibliographique

Tableau 4 : Matrice d'identité (%) des protéases pariétales de *L. helveticus* CIRM-BIA 103, ITGLH77 CIRM-BIA 99 et R0052, PrtS de *S. thermophilus* LMD-9, PrtR de *L. rhamnosus* GG, PrtJ *L. johnsonii* NCC 533, PrtB de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842 et PrtP de *Lc. Lactis* SK11 par ClustalW2.

Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1	PrtH	PrtH2	PrtH3	PrtH4	PrtH3 LH77	PrtB	PrtH4 R0052	PrtJ	PrtS	PrtR	PrtP
PrtH CNRZ32 CIRM-BIA 103	100	25,35	26,42	25,71	26,42	33,61	25,56	57,81	21,3	26,93	46,5
PrtH2 CNRZ32 CIRM-BIA 103	25,35	100	61,89	53,05	61,95	23,89	52,98	23,31	22,19	36,38	24,14
PrtH3 CNRZ32 CIRM-BIA 103	26,42	61,89	100	54,25	99,33	24,9	54,1	24,08	23,83	36,59	26,37
PrtH4 CNRZ32 CIRM-BIA 103	25,71	53,05	54,25	100	54,18	25,26	98,85	24,38	21,92	38,89	25,48
PrtH3 ITGLH77 CIRM-BIA 99	26,42	61,95	99,33	54,18	100	24,83	54,04	24,01	23,83	36,59	26,3
PrtB <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	33,61	23,89	24,9	25,26	24,83	100	25,24	32,64	21,94	24,77	31,82
PrtH4 <i>L. helveticus</i> R0052	25,56	52,98	54,1	98,85	54,04	25,24	100	24,16	22	38,82	25,43
PrtJ <i>L. johnsonii</i> NCC 533	57,81	23,31	24,08	24,38	24,01	32,64	24,16	100	22,74	24,52	45,2
PrtS <i>S. thermophilus</i> LMD-9	21,3	22,19	23,83	21,92	23,83	21,94	22	22,74	100	22,14	21,93
PrtR <i>L. rhamnosus</i> GG	26,93	36,38	36,59	38,89	36,59	24,77	38,82	24,52	22,14	100	27,21
PrtP <i>Lc. lactis</i> SK11	46,5	24,14	26,37	25,48	26,3	31,82	25,43	45,2	21,93	27,21	100

IV Conclusion

Les quatre protéases pariétales de *L. helveticus* sont encore peu connues tant au niveau de leur activité qu'au niveau de leur spécificité de coupure. Les résultats obtenus jusqu'à présent suggèrent que ces protéases ont un très large spectre de coupure des caséines bovines. L'activité et la spécificité de coupure de chaque protéase de *L. helveticus* reste donc encore à définir et ceci, sous différentes conditions physicochimiques, comme par exemple celles du fromage.

La protéase PrtS de *S. thermophilus* a, quant à elle, été davantage caractérisée *in vitro* dans des conditions optimales d'hydrolyse (37°C, pH 7,5), ce qui a permis de révéler une très large spécificité de coupure des caséines bovines. Son comportement dans les conditions physicochimiques du fromage reste donc encore à étudier.

L'étude de l'activité protéolytique de diverses espèces et souches de bactéries lactiques dans différentes conditions physicochimiques pourraient permettre de mettre en évidence des hydrolyses variées de caséines et la production de peptides spécifiques propres à chacune des conditions testées. Ces résultats apporteront de nouvelles connaissances sur la production de peptides techno-fonctionnels ou bioactifs lors de la fabrication de produits laitiers fermentés aux propriétés et fonctionnalités variées.

Chapitre 1
Expression hétérologue d'une des protéases
de *L. helveticus* CNRZ32 CIRM-BIA 103
chez *S. thermophilus* LMD-9

I Introduction

Afin d'étudier les protéases pariétales de la souche *L. helveticus* CNRZ32 CIRM-BIA 103 indépendamment les unes des autres, notre première stratégie a été de produire de façon hétérologue la protéase PrtH chez *S. thermophilus* LMD-9. Au début de cette étude, seuls les gènes des protéases PrtH et PrtH2 étaient connus et séquencés (Genay et al., 2009 ; Sadat-Mekmene et al., 2011b) et aucune souche de *L. helveticus* possédant uniquement le gène *prtH* n'avait été caractérisée jusqu'ici. De plus, les derniers travaux de Sadat-Mekmene et al (2011b) tendaient à montrer que la présence simultanée des deux protéases PrtH et PrtH2 améliorait l'hydrolyse de la caséine α_{s1} en conditions *in vitro*. Nous avons donc choisi de produire de façon hétérologue la protéase PrtH chez *S. thermophilus* LMD-9. Enfin, notre stratégie était appuyée sur un travail antérieur prouvant la faisabilité de l'expression hétérologue du gène *prtB* de la protéase pariétale de *Lactobacillus delbrueckii* et son activité, chez *Lc. lactis* (Germond et al., 2003). Nous avons donc voulu adapter cette stratégie à la souche *S. thermophilus* LMD-9 qui d'une part est facilement modifiable par transformation naturelle et d'autre part est souvent utilisée comme co-levain avec *L. helveticus* par exemple dans la fabrication fromagère.

Aucune protéine hétérologue n'ayant jamais été sécrétée ni ancrée à la paroi de *S. thermophilus*, le challenge de ce travail reposait donc sur la construction d'un gène chimérique et son intégration dans le génome de la souche LMD-9 pour exprimer la protéase PrtH, la sécréter puis l'ancrer sur la paroi et enfin obtenir une activité protéolytique. Nos constructions ont été établies en tenant compte de celles utilisées chez d'autres bactéries lactiques, telles que *Lc. lactis* (Germond et al., 2003 ; Le Loir et al., 2005) ainsi que des outils génétiques déjà utilisés chez *S. thermophilus*. Cette analyse fait l'objet de la première partie de la revue actuellement soumise à Food Microbiology.

II Les mécanismes d'activation de la compétence naturelle chez les streptocoques

La compétence naturelle chez les procaryotes correspond à la mise en place d'un système leur permettant de capturer de l'ADN exogène. La fonction de la compétence naturelle n'est pas encore complètement définie mais l'assimilation d'ADN exogène par la cellule bactérienne pourrait avoir deux intérêts. En premier lieu, l'hypothèse la plus étayée

serait la récupération de matériel génétique provenant d'autres cellules permettant de réparer des gènes endommagés ou augmenter la diversité génétique par acquisition de nouveaux gènes et de nouvelles fonctions. Cette hypothèse est aussi appelée l'hypothèse sexuelle (sex hypothesis). La deuxième hypothèse peut aller de pair avec la première et implique également une réponse à une carence nutritionnelle par l'absorption de nucléotides (Johnsborg et al., 2007).

La capacité de compétence est d'un intérêt primordial pour la construction de mutants et déjà largement utilisée chez un bon nombre de modèles. Selon Johnsborg et al. (2007) *Streptococcus pneumoniae* est une des espèces les mieux étudiées au niveau des mécanismes de la compétence naturelle, tout comme *Bacillus subtilis*. A ces deux espèces, viennent s'ajouter les espèces des streptocoques dont le groupe des *Salivarius* auquel *S. thermophilus* appartient (Fontaine et al., 2010a).

La compétence chez les bactéries à coloration Gram positive est une fonction induite par des oligopeptides signaux appelés phéromones de la compétence ou alarmones. Ces molécules permettent la communication entre cellules pour qu'elles coordonnent leurs fonctions physiologiques. Ces molécules sont produites en réponse à différents stress ou conditions physiologiques rencontrés par les bactéries. Lorsque les alarmones de la compétence atteignent un certain seuil de concentration, elles activent des « super » régulateurs qui, au final, induisent les gènes requis pour la compétence naturelle et la capture des fragments d'ADN potentiellement présents dans le milieu extracellulaire (Claverys et al., 2006 ; Fontaine et al., 2013 ; Johnsborg et al., 2007).

Chez les streptocoques, la compétence est initiée par la production du facteur sigma alternatif ComX qui, en s'associant à l'ARN polymérase, va reconnaître les promoteurs présentant en position -10 une séquence ADN appelée boîte-ComX et activer les gènes correspondants (Johnsborg et al., 2007). Le gène *comX* est retrouvé chez tous les streptocoques et, selon l'espèce, ce facteur sigma peut être activé par 2 types de systèmes de signalisation (master signalling systems) : le système ComCDE et le système ComRS. La Figure 11 présente la répartition de ces 2 systèmes dans les différentes espèces de Streptocoques (Håvarstein, 2010).

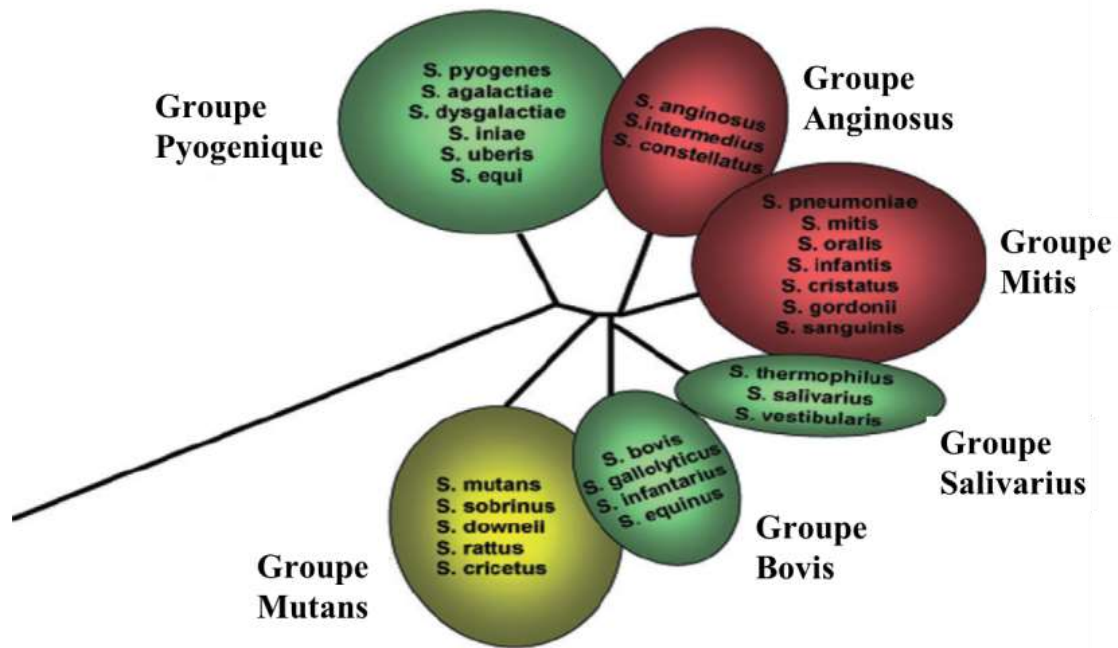


Figure 11 : Arbre phylogénétique basé sur les ARN 16S des Streptocoques. Les couleurs indiquent les systèmes de régulation de la compétence présents par groupe : rouge pour ComCDE, vert pour ComRS et jaune lorsque les deux systèmes sont retrouvés (Håvarstein, 2010).

Le système ComCDE est le plus connu et est surtout rencontré chez les groupes *Mitis* et *Anginosus*. Il a été particulièrement bien étudié chez *S. pneumoniae*. La phéromone ComC est sécrétée et maturée *via* un transporteur ABC spécifique (ComAB) libérant ainsi dans le milieu extracellulaire un oligopeptide de 17 résidus d'acides aminés appelé CSP (competence stimulating peptide). Ce peptide est détecté par une histidine kinase membranaire, ComD. Cette détection déclenche une cascade de phosphorylation jusqu'à l'activation du régulateur transcriptionnel ComE. Une fois activé, ce régulateur reconnaît une boîte ComE présente dans la séquence des promoteurs de certains gènes et active leur transcription (Martin et al., 2013). Les gènes *comCDE*, *comAB* et *comX* sont ainsi stimulés, créant alors une boucle de rétrocontrôle positif.

Le deuxième système ComRS a été découvert plus récemment chez les espèces des groupes *Mutans*, *Pyogenic* et *Bovis* (Mashburn-Warren et al., 2010) mais aussi chez le groupe *Salivarius* auquel *S. thermophilus* appartient (Fontaine et al., 2010a). C'est ce système qui active *comX*, et donc les gènes impliqués dans la compétence chez notre modèle d'étude *S. thermophilus* LMD-9. Bien qu'il manque encore quelques preuves expérimentales, le modèle ComRS est défini comme suit. ComS, le précurseur de l'alarmone, est sécrété et clivé pour libérer dans le milieu l'alarmone XIP (ComX inducing peptide). Elle reste active tant qu'elle est composée au minimum de 7 à 8 résidus. La XIP est ensuite re-importée dans la

cellule *via* le transporteur d'oligopeptide Opp (Ami). Une fois dans le cytoplasme, XIP interagit directement avec un régulateur appartenant à la famille des régulateurs transcriptionnels pléiotropes (Rgg) : ComR. Cette interaction XIP-ComR permet au régulateur de reconnaître et de se fixer sur une séquence ADN de 20 pb (motif ECom-box) qui est retrouvée au niveau des régions promotrices de *comS* et *comX*. Le facteur sigma alternatif ComX ainsi produit active alors les gènes tardifs de la compétence tels que les gènes responsables de l'acquisition d'ADN exogène.

Chez les bactéries à coloration Gram positive, le système d'importation d'ADN exogène a surtout été étudié chez *B. subtilis* (Revue Chen et Dubnau, 2004) mais aussi chez *S. pneumoniae* (Johnston et al., 2014). Le système d'importation d'ADN exogène est d'abord composé d'une sorte de pilus appelé « pilus de transformation » ou (Tfp) qui crée un passage à travers la paroi afin de capturer l'ADN au niveau de la membrane (Figure 12) (Johnston et al., 2014). Le Tfp se compose d'un complexe de protéines « pilin-like » appelées ComGC, guidant ainsi l'ADN exogène vers le récepteur ComEA (Chen et Dubnau, 2004 ; Johnston et al., 2014). Récemment, Balaban et al. (2014) ont mis en évidence une sécrétion du pilus (ou Tfp) dans le milieu et ont proposé un autre modèle dans lequel le pilus permettrait de transpercer la paroi puis serait sécrété pour, ensuite, laisser l'ADN exogène accéder à la membrane plasmique. Lorsqu'un fragment d'ADN double brin est capturé par ComEA à la surface de la membrane plasmique, une partie de ce fragment est ensuite clivée par la nucléase EndA. Le fragment d'ADN restant attaché à ComEA est alors acheminé par le canal ComEC à travers la membrane plasmique (Chen et Dubnau, 2004 ; Johnston et al., 2014). Le brin d'ADN orienté dans le sens 3'-5' est enfin transporté de façon active *via* l'hydrolyse de molécules d'ATP dans le cytoplasme par ComFA (Chen et Dubnau, 2004 ; Johnston et al., 2014). Simultanément, l'autre brin est hydrolysé par une nucléase identifiée comme étant EndA chez *S. pneumoniae* (Johnston et al., 2014).

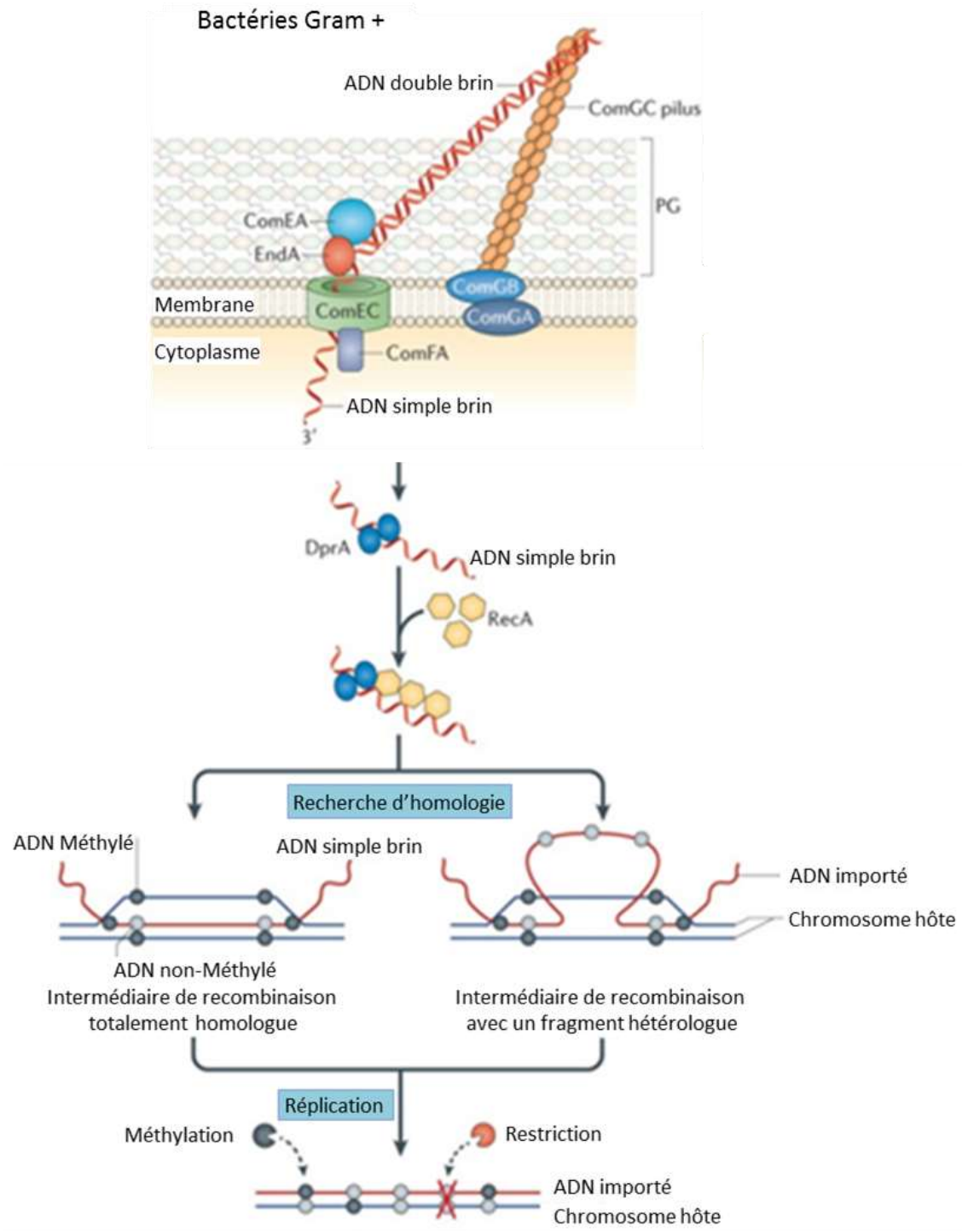


Figure 12 : Vue d'ensemble du processus de transformation naturelle chez les bactéries à coloration Gram positive (Johnston et al., 2014).

Enfin, dans un dernier temps, l'ADN simple brin internalisé est pris en charge par une protéine DprA (DNA processing A), produite spécifiquement pour se fixer et prendre en charge les ADN simple brin lors de la transformation. C'est DprA qui, ensuite, recrute la recombinaise RecA sur l'ADN simple brin. Les gènes correspondant à ces deux protéines sont aussi activés lors de la phase tardive de la compétence (Johnston et al., 2014). Enfin, RecA, une fois attachée à l'ADN simple brin, joue un rôle dans la recherche de séquences homologues dans le chromosome. Ce complexe formé par les brins d'ADN endogènes et exogènes aboutira à une recombinaison soit totalement homologue ou bien une recombinaison en partie hétérologue si la séquence hétérologue est encadrée par des séquences homologues au chromosome comme montré Figure 12. Il est à noter que, comme dans tout processus d'insertion d'ADN exogène dans le chromosome, le système de restriction – modification de la cellule peut fortement diminuer l'efficacité de la transformation (bas de la Figure 12) (Johnston et al., 2014).

Les souches de *S. thermophilus* dont le génome a été entièrement séquencé, et dont *S. thermophilus* LMD-9 fait partie, possèdent des gènes homologues à *comEA*, *comEC* et *comFA*. Il y a donc de fortes présomptions pour que chez l'espèce *S. thermophilus*, la capture, l'assimilation et l'intégration d'ADN exogène dans le chromosome soient similaire au modèle précédemment développé.

La transformation naturelle a déjà été utilisée pour transformer différentes souches de *S. thermophilus* dont la souche LMD-9 et son efficacité a pu être comparée à la transformation artificielle utilisant l'électroporation. Le taux de transformants obtenus par transformation naturelle peut aller jusqu'à 1.3×10^1 correspondant au ratio du nombre de transformants en unité formant colonie (UFC) sur le nombre d'UFC initiale pour 1 μg d'ADN). Selon les souches, la transformation naturelle peut nécessiter l'ajout dans le milieu du peptide ComS pour déclencher la compétence (Fontaine et al., 2010a, 2010b). Enfin, l'efficacité de transformation est telle qu'il est désormais envisageable de réaliser des mutations sans utiliser de marqueurs de sélection. Cette méthode permet aussi de s'affranchir des constructions plasmidiques au profit de fragments d'ADN linéaires présentant deux zones homologues au chromosome de part et d'autre de la séquence d'ADN à insérer dans le chromosome (Fontaine et al., 2010b).

III L'expression hétérologue chez *Streptococcus thermophilus*

III.A Les outils génétiques

La transformation naturelle chez *S. thermophilus* est un atout majeur pour toute manipulation génétique, permettant ainsi de l'utiliser comme outil d'expression hétérologue. Toutefois, exprimer un gène de façon hétérologue nécessite de maîtriser au mieux les différentes étapes de l'expression d'un gène et de connaître les outils génétiques utilisables chez l'hôte. Cela a été développé dans la première partie de la revue CBL (Annexe p.207, partie 2 : « Available tools for heterologous expression in *S. thermophilus* »)

III.B Les mécanismes de sécrétion

Les protéines associées à la paroi cellulaire transitent par un des systèmes de sécrétion de la souche hôte. Il est donc préférable de connaître au mieux ces systèmes pour réussir la sécrétion de la protéine hétérologue. Nous nous sommes focalisés sur les systèmes les plus favorables à la sécrétion de protéines ancrées à la surface de la cellule chez *S. thermophilus*. La sécrétion de protéines chez les procaryotes, qu'elles soient ancrées à la surface de la cellule ou libérées dans le milieu extracellulaire, peut se réaliser *via* différents systèmes de sécrétion qui les prennent en charge dès le début de leur traduction par des protéines chaperonnes jusqu'à leur exportation (ou translocation) à travers la membrane plasmique. Généralement, deux systèmes de sécrétion sont retrouvés chez les bactéries à coloration Gram positive et, *a fortiori*, chez *L. helveticus* et *S. thermophilus* (Figure 13) : le système Twin-Arginine Translocation (Tat) qui sécrète des protéines déjà conformées dans le cytoplasme et le système Sec, système majoritairement utilisé pour la sécrétion. D'autres transporteurs de type ABC peuvent être exprimés afin de spécifiquement sécréter certaines protéines telles que GspB chez *S. gordonii*, qui est glycosylée et donc trop volumineuse pour le système Sec (Bensing et Sullam, 2002 ; Schneewind et Missiakas, 2012). Les gènes codant ce type de transporteurs spécifiques, comme les protéines SecA2 et SecY2 chez *S. gordonii*, n'ont pas été identifiés dans les génomes de *L. helveticus* ou *S. thermophilus*.

III.B.1 Le système Tat et le système Sec

Chez les bactéries à coloration Gram positive, le système Tat (Figure 13) est constitué de deux ou trois protéines transmembranaires (TatA et TatC ou TatA, TatB et TatC) qui,

ensemble, forment un translocon capable d'exporter des protéines déjà conformées. Chez *S. thermophilus* LMD-9, seules deux protéines (TatA et TatC) composent ce système et le peptide signal reconnu spécifiquement par le système Tat a été détecté dans 16 séquences protéiques de *S. thermophilus* LMD-9 (Goh et al., 2011). Aucune des protéases de notre étude ne possède de peptide signal reconnu par ce système. Ces dernières doivent donc être sécrétées *via* le système Sec.

C'est par le système Sec, voie de sécrétion la plus utilisée chez les procaryotes, que transitent les protéines sécrétées et les protéines transmembranaires ou les lipoprotéines. Généralement, chez les bactéries à coloration Gram positive, le système Sec se compose d'un translocon, formé par trois protéines transmembranaires (SecY, SecE et SecG) qui s'associent et forment le canal par lequel les protéines sont sécrétées. Sont associées au translocon deux protéines cytoplasmiques, SecA et FtsY, chacune impliquée dans la reconnaissance d'un complexe « protéine précurseur - système chaperon ». La protéine FtsY est la cible du complexe ribonucléoprotéique-chaperon appelé SRP (signal recognition particule) et SecA est la cible de protéines chaperonnes comme SecB ou PrsA. De plus, la protéine SecA joue un rôle dans la sécrétion active des protéines précurseur grâce à son activité ATPasique. Elle est le moteur de la machinerie de sécrétion qui pousse les précurseurs dans le translocon (Schneewind et Missiakas, 2012). Les protéines SecD, SecF et YajC forment un complexe SecDF/YajC responsable du relargage des protéines sécrétées par le translocon. Enfin, YidC est impliquée dans l'insertion des protéines dans la membrane (Schneewind et Missiakas, 2012 ; Smitha et Anne, 2011). Les gènes correspondant aux différentes protéines composant le système Sec ont été recherchés par homologie de séquence dans les génomes de *S. thermophilus* LMD-9 et *L. helveticus* CNRZ32. Seuls les gènes correspondant aux protéines SecD et SecF n'ont pas d'homologues dans les génomes de *S. thermophilus* LMD-9 ni de *L. helveticus* CNRZ32.

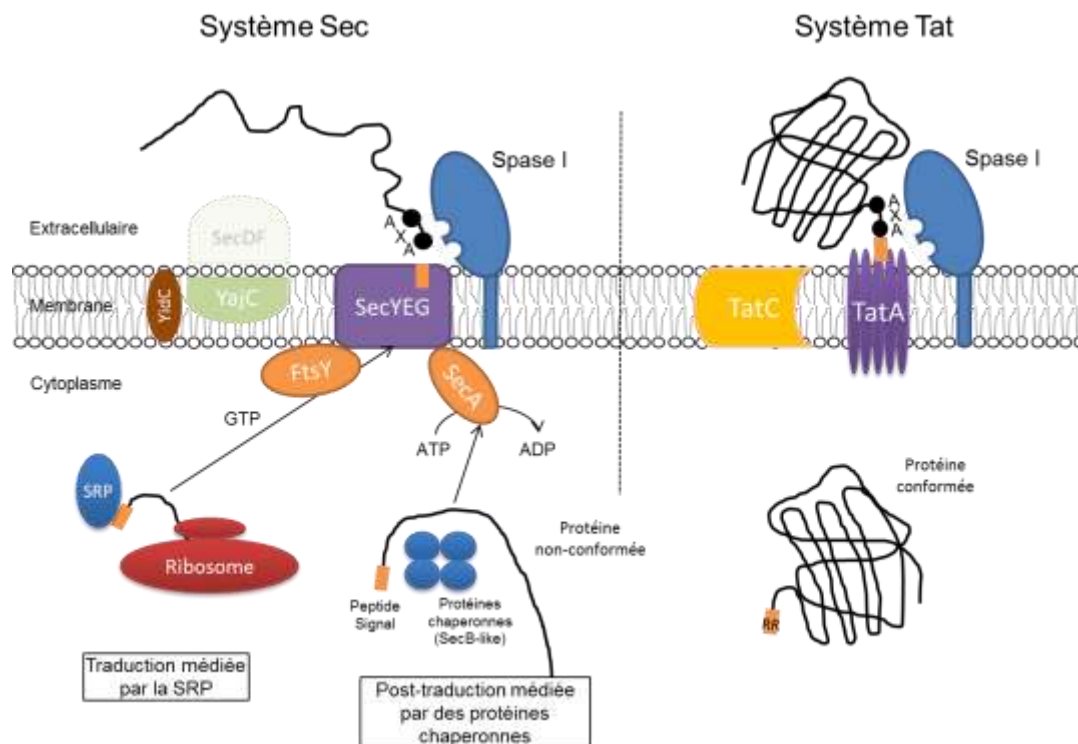


Figure 13 : Représentation schématique des systèmes de sécrétion Sec et Tat, retrouvés chez *L. helveticus* et *S. thermophilus* (Smitha et Anne, 2011).

III.B.2 Les systèmes chaperons

Avant d'atteindre le système de transport membranaire (translocon), les protéines peuvent être prises en charge, dès le début ou à la fin de leur traduction, par un système « chaperon » qui permet l'acheminement vers le translocon membranaire (Figure 13 et Figure 14). Ces systèmes reconnaissent spécifiquement une séquence signal (ou peptide signal) localisée à l'extrémité N-terminale de la protéine. Deux systèmes chaperons ont été largement étudiés chez *Escherichia coli* : la SRP (signal recognition particule), qui est un complexe ribonucléoprotéique (ARN 4,5S et la protéine Ffh), et une protéine chaperonne telle que SecB. D'autres protéines chaperonnes pourraient aussi contribuer à la sécrétion chez les bactéries à coloration Gram positive telles que les « heat shock proteins » DnaK, DnaJ et GrpE, les protéines « trigger factor » ou les peptidyl-isomérases (Schneewind et Missiakas, 2012). La différence entre ces deux systèmes chaperons réside dans le type de protéines qu'ils prennent en charge. La SRP serait plutôt destinée aux protéines membranaires et SecB pour les protéines sécrétées comme PrtS. Le choix du système chaperon serait déterminé en fonction de l'hydropathie du peptide signal (Navarre et Schneewind, 1999). Chez *E. coli*, les peptides signal des protéines membranaires, qui correspondent au premier domaine transmembranaire, sont significativement plus hydrophobes que les peptides signal des

protéines sécrétées (Lee et Bernstein, 2001). Il a aussi été démontré que d'autres protéines peuvent intervenir dans le « choix » du système comme la protéine de réponse au stress DnaK ou encore la protéine « trigger factor », une isomérase peptidyl-prolyl associée au ribosome, qui peut se fixer sur la pro-protéine et ainsi empêcher la fixation de la SRP (Beck et al., 2000). Chez *B. subtilis*, ce serait la protéine CsaA, ayant une affinité pour SecA et les pré-protéines, qui remplacerait SecB dans le rôle de la protéine chaperonne pour les protéines sécrétées (Muller et al., 2000). Des gènes correspondant aux deux systèmes sus-présentés sont retrouvés dans le chromosome de *S. thermophilus* LMD-9 (Goh et al., 2011). Il est à noter que chez *S. thermophilus*, une protéine hypothétique (STER_0458) a été identifiée comme possédant un domaine « SecB » (domaine InterPro : IPR003708). Cependant, cela ne pourrait être qu'un domaine de liaison à l'ADN car la protéine STER_0458 semble conservée uniquement dans la famille des streptocoques. De plus, il n'a pas été trouvé de similarité entre la séquence de STER_0458 et d'autres protéines chaperonnes comme SecB. Enfin, il est aussi possible que certaines pré-protéines puissent reconnaître spécifiquement SecA sans nécessiter l'aide d'aucun système chaperon (Fekkes et Driessen, 1999) (Figure 14).

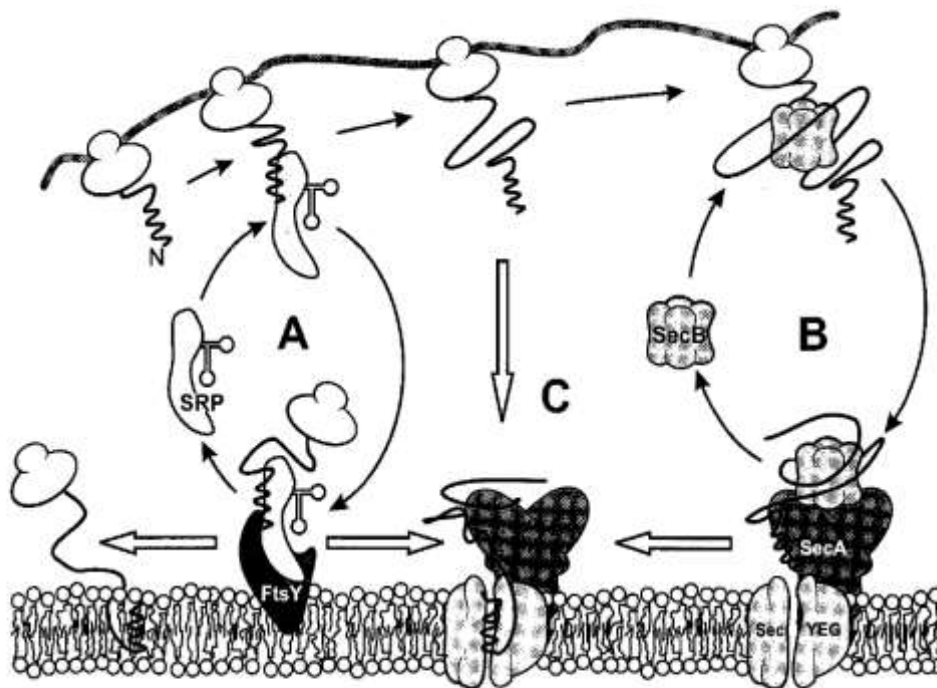


Figure 14 : Représentation schématique des différents modes d'acheminement des pré-protéines vers le système Sec connus chez les procaryotes. Trois acheminements sont représentés : A) prise en charge du peptide signal et du ribosome par la SRP, B) prise en charge de la pré-protéine par une protéine chaperonne telle que SecB et C) la séquence signal de la pré-protéine permettrait à elle seule l'acheminement vers SecA (Fekkes et Driessen, 1999).

Les systèmes chaperons utilisés lors de la sécrétion des protéines chez *S. thermophilus* et *L. helveticus* restent donc peu connus. Afin d'optimiser la sécrétion d'une protéine hétérologue chez *S. thermophilus*, il est préférable d'utiliser un peptide signal propre à l'hôte.

III.B.3 Les peptides signal

La sécrétion est initiée par la reconnaissance d'un peptide signal. Les protéines précurseur (pré-protéines) présentant un peptide signal sont menées au système de sécrétion adéquat puis exportées à travers la membrane plasmique. Tous les peptides signal (Figure 15) sont structurés comme suit : une région N-terminale comprenant des résidus chargés positivement (n-region), suivie d'une région hydrophobe (h-region) puis une région C-terminale (c-region) contenant le site de reconnaissance de la signal peptidase (AXA) (Smitha et Anne, 2011). La région hydrophobe est suffisante pour que la pré-protéine soit reconnue et exportée à travers la membrane (Bae et Schneewind, 2003).

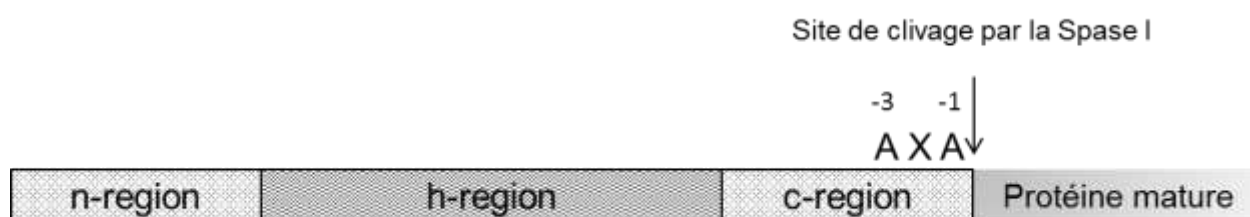


Figure 15 : Représentation schématique des différentes structures composant généralement un peptide signal : la région N-terminale (n-region) comprend des résidus chargés positivement, la région hydrophobe (h-region), la région C-terminale (c-region) qui contient le site de reconnaissance de la signal peptidase (AXA) (Smitha et Anne, 2011).

Les peptides signal des protéines sécrétées sont répartis en 2 grandes familles. Les peptides signal de type I sont retrouvés en amont de la séquence des pré-protéines sécrétées non-lipoprotéiques (qui ne sont pas attachées à la membrane plasmique de façon covalente) et sont reconnus par des peptidases signal de type I. Les peptides signal de type II sont retrouvés en amont des séquences des pré-protéines lipoprotéiques et ces séquences sont reconnues et clivées par les peptidases de type II (Smitha et Anne, 2011).

Parmi les peptides signal des bactéries à coloration Gram positive, une séquence particulière est retrouvée chez certains précurseurs de protéines sécrétées : YSIRK/GS (Carlsson et al., 2006 ; Schneewind et Missiakas, 2012). D'après DeDent et al. (2008), la majorité des espèces qui présentent une séquence YSIRK/GS dans leurs peptides signal sont des bactéries à coloration Gram positive à forme sphérique (cocci). Ceci explique l'absence

de cette séquence dans les peptides signal retrouvés chez *L. helveticus*. Les premiers travaux portant sur la localisation des protéines pariétales (septum de division ou sur le pôle de la cellule) ont permis de conclure que les peptides signal YSIRK/GS permettent de sécréter la protéine au niveau du site de division (septum) de la cellule. Une autre conclusion a abouti à une règle qui stipule que la localisation de la protéine à la surface de la cellule est dépendante de la présence ou non de la séquence YSIRK/GS dans le peptide signal. Cependant, elle n'est pas validée chez toutes les espèces. En effet, Carlson et al (2006) et Dedent et al (2008) ont démontré que chez les bactéries « GAS » (Groupe A des Streptocoques) et *Staphylococcus aureus*, les peptides signal possédant la séquence YSIRK/GS localisent la protéine au niveau du point où se forme le septum de division de la cellule alors que les autres peptides signal localisent les protéines aux pôles de la cellule. Cependant, Brega et al. (2013) ont démontré que ce n'était pas le cas chez les bactéries « GBS » (Groupe B des Streptocoques) qui peuvent sécréter des protéines au niveau du septum bien qu'elles ne possèdent pas la séquence YSIRK/GS dans leur peptide signal. Enfin, il a été montré que la présence de cette séquence améliore le taux de protéines sécrétées chez *Staphylococcus aureus* (Yu et Gotz, 2012).

Chez *S. thermophilus*, on retrouve des séquences YSIRK/GS dans certains peptides signal tels que celui de la protéase de paroi PrtS (LAB secretome, Zhou et al., 2010). En effet, en comparant la séquence du peptide signal de PrtS avec la séquence consensus du motif YSIRK/GS, ([YF]SIRKxxxGxxS[VIA]), seul le résidu isoleucine (I) est substitué par un résidu leucine (L). Ces deux acides aminés étant similaires et étant donné que le peptide signal a été annoté automatiquement comme faisant partie de la famille des peptides signal YSIRK (pfam04650), le peptide signal de PrtS est bien de type YSIRK/GS impliquant les régulations inhérentes à cette séquence du peptide signal. Ceci indique donc que la protéase de paroi PrtS serait sécrétée au niveau du site de formation du septum.

Concernant l'expression hétérologue des protéases pariétales de *L. helveticus* chez *S. thermophilus*, il est donc préférable d'utiliser le peptide signal d'une protéine sécrétée chez *S. thermophilus*, tel que celui de PrtS qui possède la séquence YSIRK/GS, afin de localiser la sécrétion de la protéase hétérologue au niveau du site de formation du septum tout comme PrtS.

III.C *Les différents ancrages des protéines pariétales sur la paroi des bactéries lactiques*

Les protéines retrouvées sur la paroi des bactéries à coloration Gram positive possèdent, dans leur séquence, des motifs voire des domaines leur permettant de s'attacher à la paroi ou à la membrane plasmique. L'attachement peut se faire de façon covalente, par des interactions électrostatiques ou encore par des interactions hydrophobes avec les constituants de la paroi (peptidoglycane, protéines, EPS, ...) ou de la membrane (phospholipides, protéines, ...). Le terme d'ancrage sera plutôt utilisé pour les protéines liées de façon covalente à la paroi ou la membrane (y compris les domaines transmembranaires). Dans les autres cas, le terme « attachement » sera utilisé (Leenhouts et al., 1999).

III.C.1 *Le motif LPXTG et la sortase (SrtA)*

Le motif d'ancrage LPXTG est le motif le plus utilisé pour ancrer des protéines hétérologues chez les bactéries lactiques (Leenhouts et al., 1999). Ce motif (Figure 16) est toujours suivi d'une séquence d'une trentaine de résidus d'acides aminés hydrophobes, séquence dont la longueur varie selon les espèces (Schneewind et al., 1993), puis d'une courte queue composée de résidus d'acides aminés chargés positivement. Cette queue chargée et le domaine hydrophobe ancrent temporairement la protéine à la membrane. Le domaine hydrophobe joue le rôle d'un domaine transmembranaire et la queue chargée interagit avec la membrane (chargée négativement), coté cytoplasmique. Ceci positionne correctement la protéine afin qu'elle soit ancrée au peptidoglycane par son motif LPXTG *via* l'action de la sortase (Leenhouts et al., 1999 ; Marraffini et al., 2006). Cette dernière est une transpeptidase ancrée à la membrane possédant une cystéine dans son site actif qui clive la liaison peptidique entre le résidu thréonine (T) et le résidu glycine (G) du motif LPXTG puis établit une liaison covalente entre le résidu cystéine de la sortase et le résidu thréonine libéré. La sortase catalyse ensuite l'établissement de la liaison peptidique entre le résidu thréonine (T) du motif LPXTG et le résidu glycine (G) du pentapeptide du lipide II (précurseur du peptidoglycane) (Marraffini et al., 2006). Ainsi l'ancrage d'une protéine via le motif LPXTG est dépendant du bon fonctionnement de la sortase (SrtA chez *S. thermophilus* LMD-9). Chez *S. thermophilus* LMD-9, seulement trois protéines pariétales ont été identifiées comme porteuses du motif LPXTG dont la protéase de paroi PrtS (Goh et al., 2011). Le faible nombre de protéines utilisant ce type d'attachement chez *S. thermophilus* LMD-9 à cause, semble-t-il, de la perte de gènes de virulence au cours de son évolution, laisse présager qu'un grand nombre de sites d'ancrage seraient alors disponible pour ancrer d'autres protéines sur la paroi avec le motif

LPXTG. Ces emplacements vacants pourraient être utilisés lors de surproduction protéiques. En effet, en cas de surproduction de protéines sur une paroi présentant naturellement une forte quantité de protéines pariétales, des problèmes liés à des interactions non souhaitées avec ces autres protéines pariétales dus à l'encombrement stérique sur la paroi pourraient être rencontrés. Ce type d'ancrage de protéines par le motif LPXTG pourrait alors être une option intéressante pour sécréter et/ou surproduire des protéines ancrées à la paroi chez *S. thermophilus*.

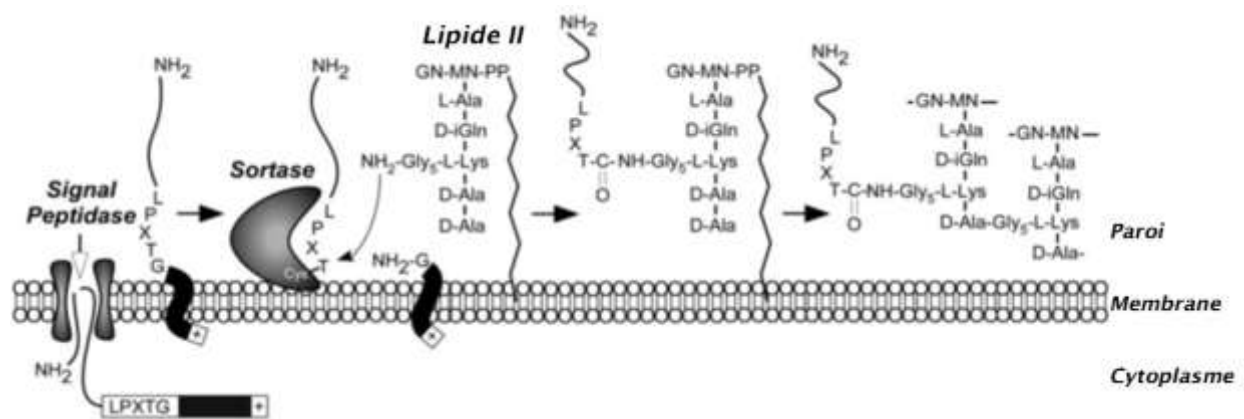


Figure 16 : Système d'ancrage des protéines pariétales à la paroi par le motif LPXTG et action de la sortase. La protéine pariétale est sécrétée *via* le système Sec et reste ancrée à la membrane grâce à un domaine hydrophobe transmembranaire et une courte queue chargée positivement, côté cytoplasmique (bande noire suivie d'une bande +). Ces deux domaines situés en aval du motif LPXTG permettent, en restant enchassés temporairement à la membrane, le bon positionnement du motif LPXTG pour qu'il interagisse avec la sortase. Cette dernière catalyse la formation d'une liaison covalente entre le résidu thréonine (T) du motif LPXTG et un résidu glycine (G) du pentapeptide du Lipide II. Ce Lipide II précurseur du peptidoglycane est ensuite intégré dans le peptidoglycane (Marraffini et al., 2006).

III.C.2 Domaine d'attachement des protéines S-Layer

Les protéines S-layer sont des protéines ou glycoprotéines retrouvées au niveau de la couche la plus externe à la surface de nombreuses bactéries et archaebactéries. Toutes possèdent un domaine d'attachement appelé domaine S-layer qui peut être retrouvé en N-terminal ou en C-terminal selon les protéines. Chez les lactobacilles, le domaine d'attachement S-layer interagit avec les différents composants de la paroi selon l'espèce. *A priori*, l'attachement de ce domaine à la paroi est dû à l'interaction entre les résidus d'acides aminés basiques du domaine d'attachement et les polymères chargés négativement présents dans la paroi. Ainsi, chez *L. acidophilus* et *L. crispatus*, ces interactions se produisent avec les acides (lipo)téichoïques de la paroi alors que chez *L. brevis* (Åvall-Jääskeläinen et al., 2008)

et *L. buchneri* (Masuda et Kawata, 1983), ces interactions se produisent avec les polysaccharides neutres de la paroi.

L. helveticus possède aussi une couche de S-layer sur sa paroi et ses protéases pariétales présentent toutes un domaine d'attachement S-layer. Cependant, les composants de la paroi qui interagissent avec le domaine d'attachement n'ont pas encore été identifiés (Sleytr et Beveridge, 1999). En revanche, aucune protéine S-layer ni aucun domaine d'attachement n'a été retrouvé chez *S. thermophilus*. Enfin, Hu et al. (2011) ont démontré que le domaine d'attachement S-layer avait peu d'affinité pour la paroi de *S. thermophilus* ou de *Lc. lactis* contrairement aux parois d'autres bactéries lactiques comme *L. helveticus* ou *L. delbrueckii*.

III.C.3 Les autres systèmes d'ancrage

D'autres domaines d'ancrages et d'attachement sont retrouvés sur les parois des bactéries lactiques (Leenhouts et al., 1999) : i) les domaines d'ancrage transmembranaires sont enchassés dans la membrane plasmique ; ii) les lipoprotéines sont attachées de façon covalente à la double couche lipidique par une modification N-acyl diglycéride d'un résidu cystéine localisé juste après le C-terminal du site de clivage de la séquence signal ; iii) le domaine d'attachement AcmA, proche du domaine LysM, retrouvé chez les bactéries à coloration Gram positive (Buist et al., 1995), est retrouvé sur presque toutes les hydrolases de la paroi cellulaire et est constitué de répétitions homologues qui interagissent avec la paroi par des liaisons hydrophobes ou électrostatiques. Ces autres types d'ancrages pourraient être utilisés comme alternative au domaine LPXTG pour attacher une protéine hétérologue à la surface de la bactérie (Leenhouts et al., 1999).

III.D *L'environnement pariétal chez L. helveticus et S. thermophilus et son interaction avec les protéases pariétales*

L'expression hétérologue d'une protéase de paroi nécessite de prendre en compte les différences des environnements physico-chimiques entre la souche initiale et la souche hôte. Ainsi ces différences peuvent-être évaluées en tenant compte pour chacune des deux parois de leur composants qui possèdent des propriétés physico-chimiques qui leurs sont propres et qui peuvent jouer un rôle dans l'ancrage ou l'attachement des protéases de paroi mais aussi sur leur bonne conformation. Les protéases de paroi de *L. helveticus* et *S. thermophilus* interagissent avec les différents composants de la paroi bactérienne au moins au niveau de leurs domaines H, W et AN. Ces interactions sont définies à la fois par la séquence primaire des résidus d'acides aminés de chacune des protéases mais aussi par la composition de la paroi (peptidoglycane, acides lipotéichoïques et téichoïques...).

III.D.1 *Les composants du peptidoglycane*

La paroi des bactéries à coloration Gram positive est principalement constituée par une structure composée de peptides et de glucides : le peptidoglycane ou muréine (Figure 17). C'est un filet de protection autour de la cellule qui peut résister à des contraintes physiques importantes telles que des pressions de turgescence (jusqu'à 20 atm) ou des forces de cisaillement. De plus, les mailles du peptidoglycane forment un tamis qui ne laisse passer que des molécules de taille inférieure à 55 kDa (Revue Delcour et al., 1999). Il est à noter que les protéases de parois ont des poids moléculaires supérieurs à 55kDa. Ceci implique donc un mode de sécrétion spécifique afin de laisser passer ces protéases hors de la paroi pour atteindre leur substrat.

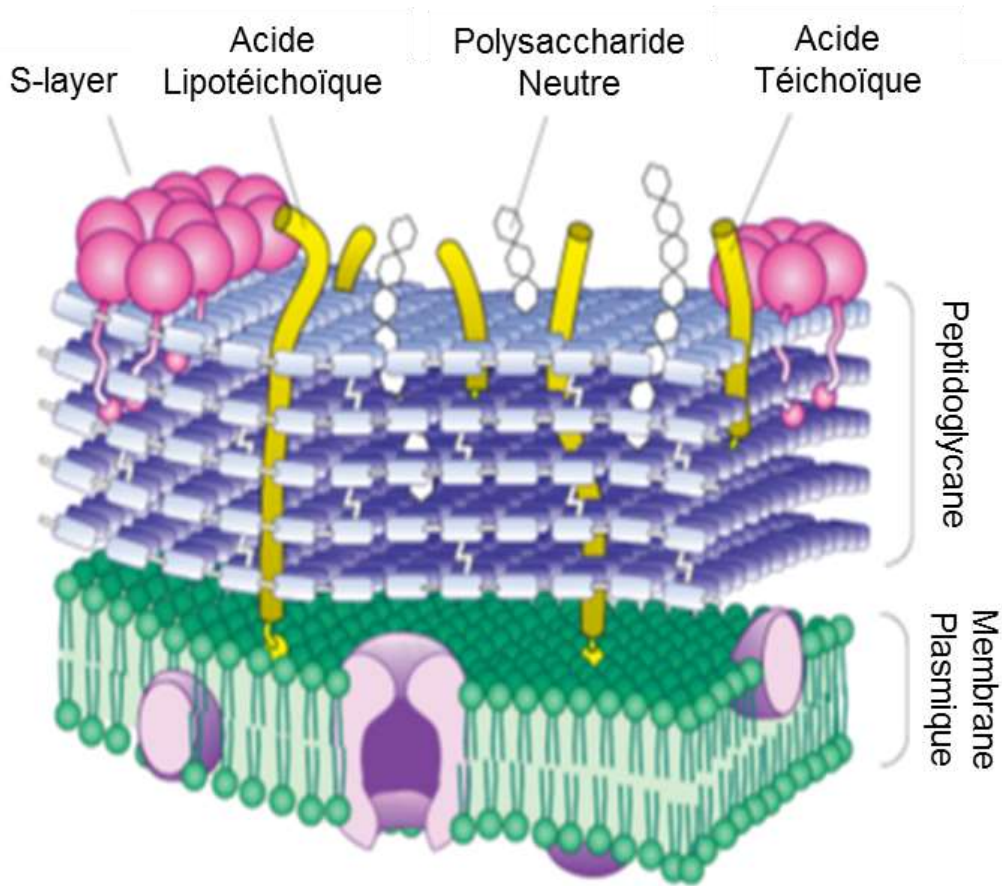
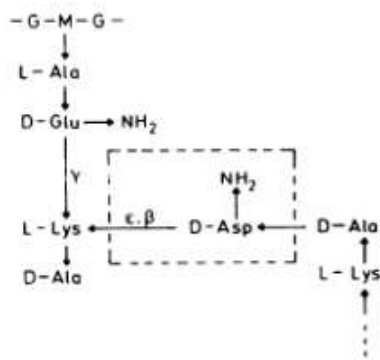


Figure 17 : Représentation de la paroi d'une bactérie à coloration Gram positive avec ses composants principaux (Revue Delcour et al., 1999).

Les chaînes glucidiques du peptidoglycane sont construites par l'alternance de deux sucres : le N-acétyl-glucosamine (NAG) et l'acide N-acétyl-muramique (NAM) qui sont liés par des liaisons osidiques ($\beta 1-4$). Sur chaque NAM est fixé un peptide de cinq acides aminés par une L-alanine. Chez les bactéries lactiques, la séquence consensus en acides aminés est : L-alanine/D-glutamate/(acide meso-diaminopimelique ou L-lysine)/D-alanine/D-alanine et cette séquence est la même chez *L. helveticus* et *S. thermophilus* avec une L-lysine en troisième position. Ces peptides vont assurer la liaison entre les chaînes glucidiques en formant un pont peptidique entre les résidus NAM et la composition de ces ponts varie selon l'espèce bactérienne (Revue Delcour et al., 1999). Chez *L. helveticus*, la structure primaire du peptidoglycane serait retrouvée telle que présentée Figure 18 A et chez *S. thermophilus* telle que présentée Figure 18 B (Revue Schleifer et Kandler, 1972). On observe une différence de composition des ponts peptidiques entre ces deux espèces. Par exemple *L. helveticus* présente un résidu asparagine, dont la chaîne latérale est polaire et hydrophile, qui pourrait jouer un rôle dans l'attachement des protéines pariétales de cette espèce.

A)



B)

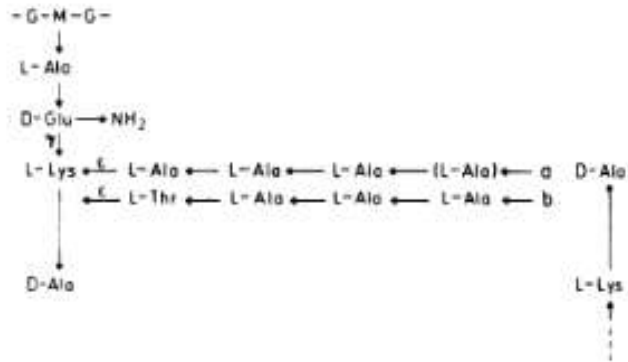


Figure 18 : Fragments de la structure primaire du peptidoglycane de *L. helveticus* (A) et *S. thermophilus* (B) (Revue Schleifer et Kandler, 1972).

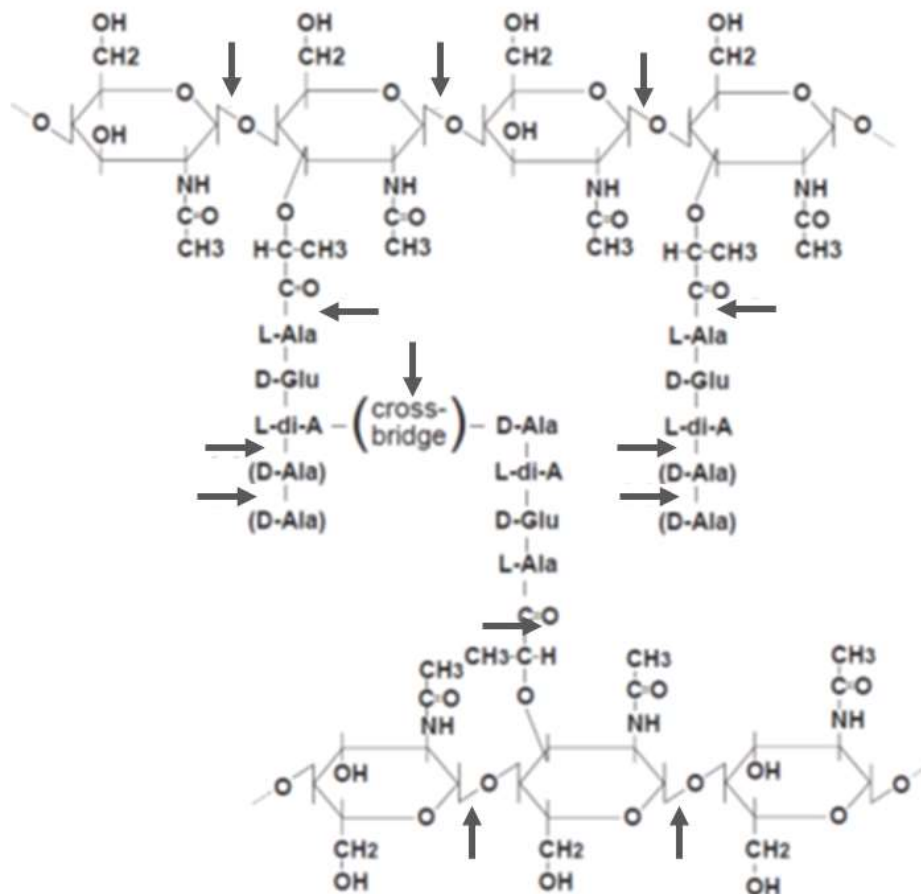


Figure 19 : Mode d'action des hydrolases du peptidoglycane, représentées par des flèches (Revue Schleifer et Kandler, 1972).

Lors de la croissance cellulaire, le peptidoglycane doit suivre l'extension de la cellule. Pour cela, la cellule va produire différentes hydrolases (flèches représentées sur la Figure 19) qui vont couper le peptidoglycane à des sites spécifiques.

Les hydrolases sont divisées en deux groupes : le premier groupe n'affaiblit pas la stabilité des structures 2D et 3D du peptidoglycane, comme les D,D- ou L,D-carboxypeptidases ; le second regroupe les autolysines, qui hydrolysent les liaisons glucidiques et les ponts peptidiques. Les autolysines déstabilisent le peptidoglycane en cassant les mailles ce qui permet l'ajout de nouveau matériel (NAG-NAM-pentapeptide). Ce relâchement du maillage du peptidoglycane pendant la croissance de la cellule pourrait expliquer comment les grosses protéines (>55 kDa) passeraient la paroi lors de la sécrétion ou de leur positionnement à la surface de la paroi comme la levansucrase chez *B. subtilis* et, dans nos modèles, les protéases de paroi. Ces dernières seraient donc libérées hors de la paroi tout en restant attachées ou ancrées à la paroi.

III.D.2 Les acides téichoïques

La paroi des bactéries à coloration Gram positive comporte aussi la plupart du temps des acides téichoïques. Chez les bactéries lactiques, ces chaînes glucidiques jouent un rôle prépondérant dans les différentes fonctionnalités de la paroi cellulaire. Les acides téichoïques sont décrits d'après leur chaîne glucidique et leur mode d'ancrage. Les acides lipotéichoïques et lipoglycanes sont attachés aux lipides de la membrane cytoplasmique, les acides téichoïques et les acides téichuroniques ne sont pas ancrés et peuvent être retrouvés dans le milieu et enfin, les acides téichoïques de paroi sont attachés de façon covalente au peptidoglycane (Neuhaus et Baddiley, 2003).

Les acides téichoïques peuvent être utilisés comme réservoir de phosphate, leurs propriétés anioniques leur confèrent la capacité de piéger des cations comme les ions Magnésium (Mg^{2+}) ce qui créerait un gradient de pH dans la paroi. Les acides lipotéichoïques sont en grande partie responsables de l'hydrophobicité de l'enveloppe cellulaire et influencent l'activité des autolysines (Schleifer et Kandler, 1972).

III.D.3 Les protéines S-layer

Parmi les bactéries lactiques, les lactobacilles présentent une particularité au niveau de leur paroi puisqu'elle est recouverte d'une couche de protéines S-layer. Cette couche forme

une carapace protectrice très résistante autour de la cellule et joue un rôle de tamis bloquant les molécules de poids moléculaire supérieur à 10 ou 15 kDa (Sára et al., 1990 ; repris par Lortal et al., 1992). Cependant, ces tamis seraient percés de pores de 2 à 8 nm sur 70 % de la surface cellulaire permettant ainsi le passage de molécules plus volumineuses (Sleytr et Beveridge, 1999). Les protéines S-layer retrouvées chez les lactobacilles sont des protéines allant de 40 à 70 kDa et généralement non glycosylées. Ces protéines, sécrétées puis attachées à la paroi, sont fortement basiques et possèdent de nombreux résidus d'acides aminés hydrophobes et un faible taux de résidus soufrés. Il a été noté aussi une quasi-totale absence de résidu cystéine ce qui proscrit toute liaison *via* des ponts disulfures (Åvall-Jääskeläinen et Palva, 2005). Cette carapace formerait donc un environnement hydrophobe et chargé positivement qui pourrait interagir avec les protéases pariétales des lactobacilles.

Chez *L. helveticus*, les S-layer ont d'abord été mises en évidence par Masuda et Kawata (1983) puis plus détaillé par Lortal et al, (1991, 1992). La souche (ATCC 12046) utilisée pour l'étude présentait une protéine de 52 kDa sur la couche la plus externe de la paroi. Bien que pour cette souche et la majorité des lactobacilles, aucune glycosylation n'a été détectée sur leurs protéines S-layer, de récents travaux sur des souches de *L. helveticus* ont présenté six S-layers glycosylées (Wasko et al., 2014). La glycosylation et les différentes protéines associées à la S-layer peuvent influencer la charge du manteau de S-layer et ainsi créer un environnement physicochimique spécifique à chaque souche.

D'autre part, les S-layers sont attachées à la paroi et entre elles par des liaisons fortes, mais non-covalentes, grâce à des motifs S-layer (Sleytr et Beveridge, 1999). Ces motifs responsables de l'attachement à la paroi ont été assignés à un domaine protéique pfam03217 (Boot et al, 1995) et sont aussi retrouvés chez d'autres protéines pariétales de lactobacilles comme les protéases de paroi ou d'autres protéines appelées « protéines associées aux S-layer ». Cependant, ce domaine ne différencie pas les protéines formant la carapace de protéine à proprement dites S-layer et les protéines associées aux S-layer (Johnson et al., 2013). Ces interactions protéiques rendent encore plus complexes l'environnement physicochimique autour de cette carapace de protéines S-layer.

Toutes les informations sur l'environnement pariétal qui viennent d'être développées montrent qu'il diffère de façon importante entre *L. helveticus* et *S. thermophilus*. Cela est particulièrement remarquable au niveau de l'extrémité extérieure de la paroi de *L. helveticus* avec les protéines S-layers et leurs protéines associées possédant des domaines de type S-layer. Ces différences ont donc été prises en compte dans la construction des mutants.

Chapitre 1

Ainsi, une de nos stratégies a été de construire une protéase chimérique possédant des domaines interagissant avec la paroi spécifiques à *S. thermophilus*. Cependant, comme nous ne connaissons pas encore la disposition des protéases de *L. helveticus* au niveau de la paroi, il serait possible que les S-layer apportent un environnement physico-chimique propice à la stabilité voire à l'orientation des protéases pariétales à la surface de *L. helveticus*. Cela pourrait alors affecter l'activité protéolytique.

IV La souche naturellement compétente *Streptococcus thermophilus* LMD-9, un nouvel outil pour ancrer des protéines hétérologues sur la surface de la cellule. (Article)

Journal : Microbial cell factories

Accepté en Juin 2014

Xavier LECOMTE^{1,2,3,4}, Valérie GAGNAIRE^{3,4}, Valérie BRIARD-BION^{3,4}, Julien JARDIN^{3,4}, Sylvie LORTAL^{3,4}, Annie DARY^{1,2} and Magali GENAY^{1,2*}.

Résumé :

Contexte : La synthèse de protéines hétérologues par des micro-organismes est largement utilisée dans les études fondamentales aux procédés industriels. La sécrétion de protéines hétérologues solubles dans le milieu extracellulaire facilite leur purification, alors que leur attachement à la surface de la cellule permet l'utilisation des cellules hôtes recombinantes comme vecteur de présentation de protéines ou de peptides. Un des points clés pour produire des protéines hétérologues est de choisir un hôte approprié. Nous proposons d'élargir le panel des hôtes capable de sécréter des protéines hétérologues avec la souche *Streptococcus thermophilus* LMD-9. Cette bactérie lactique possède le statut GRAS (generally recognise as safe), est largement utilisée dans la production de yaourts, de laits fermentés et de fromages, et est facile à transformer par compétence naturelle. Cette étude démontre la faisabilité de la sécrétion hétérologue d'une protéine ancrée à la surface de *Streptococcus thermophilus*. Pour cela nous avons utilisé la protéase pariétale PrtH de *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 CIRM-BIA 103.

Résultats : En utilisant *S. thermophilus* comme hôte, trois souches recombinantes ont été construites : i) un témoin négatif correspondant à la souche *S. thermophilus* PrtS⁻ dont le gène codant la protéase PrtS a été partiellement délété ; ii) un mutant PrtH⁺ exprimant une pro-protéine PrtH *Lactobacillus helveticus* comportant son propre motif d'attachement à la paroi de type S-layer and iii) un mutant PrtH⁺WANS exprimant une pro-protéine PrtH dont le

domaine d'ancrage correspond au motif LPXTG de la protéase PrtS. Les niveaux d'expression des gènes chimères *prtH*⁺ et *prtH*⁺*WANS* ont été mesurés par RT-qPCR chez les mutants correspondant et comparés au taux d'expression du gène *prtS* dans la souche sauvage *S. thermophilus* LMD-9. Les taux d'expression des deux gènes chimériques de *prtH*, quel que soit leur motif d'ancrage, atteignaient 76% du taux d'expression de *prtS* chez la souche sauvage. Les protéases de paroi ont été détectées et identifiées à la surface de la souche sauvage *S. thermophilus* LMD-9 et des mutants *PrH*⁺ et *PrH*⁺*WANS* en utilisant la technique du « shaving » puis en identifiant les peptides par spectrométrie de masse en tandem, démontrant ainsi la faisabilité de l'expression hétérologue et l'ancrage d'une protéine de plus de 200 kDa. Enfin, l'ancrage à la paroi cellulaire paraissait plus efficace en présence du motif d'ancrage LPXTG de PrtS qu'en présence du motif d'attachement de type S-layer de PrtH.

Conclusion : Nous avons démontré que *S. thermophilus* LMD-9 pouvait sécréter de façon hétérologue une protéine de haut poids moléculaire et de probablement l'ancrer de façon covalente à la paroi.

Mots clés : Expression hétérologue, Sécrétion, Protéine ancrée à la paroi, *Streptococcus thermophilus* LMD-9, Protéase de paroi, PrtS, PrtH, *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 CIRM-BIA 103.

RESEARCH

Open Access

The naturally competent strain *Streptococcus thermophilus* LMD-9 as a new tool to anchor heterologous proteins on the cell surface

Xavier Lecomte^{1,2,3,4}, Valérie Gagnaire^{3,4}, Valérie Briard-Bion^{3,4}, Julien Jardin^{3,4}, Sylvie Lortal^{3,4}, Annie Dary^{1,2} and Magali Genay^{1,2*}

Abstract

Background: From fundamental studies to industrial processes, synthesis of heterologous protein by micro-organisms is widely employed. The secretion of soluble heterologous proteins in the extracellular medium facilitates their recovery, while their attachment to the cell surface permits the use of the recombinant host cells as protein or peptide supports. One of the key points to carry out heterologous expression is to choose the appropriate host. We propose to enlarge the panel of heterologous secretion hosts by using *Streptococcus thermophilus* LMD-9. This lactic acid bacterium has a generally recognised as safe status, is widely used in the manufacture of yogurts, fermented milks and cheeses, and is easy to transform by natural competence. This study demonstrates the feasibility of secretion of a heterologous protein anchored to the cell surface by *S. thermophilus*. For this, we used the cell envelope proteinase (CEP) PrtH of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 CIRM-BIA 103.

Results: Using *S. thermophilus* LMD-9 as the background host, three recombinant strains were constructed: i) a negative control corresponding to *S. thermophilus* PrtS⁻ mutant where the *prtS* gene encoding its CEP was partially deleted; ii) a PrtH⁺ mutant expressing the *L. helveticus* PrtH pro-protein with its own motif (S-layer type) of cell-wall attachment and iii) a PrtH⁺WANS mutant expressing PrtH pro-protein with the LPXTG anchoring motif from PrtS. The PrtH⁺ and PrtH⁺WANS genes expression levels were measured by RT-qPCR in the corresponding mutants and compared to that of *prtS* gene in the strain LMD-9. The expression levels of both fused *prtH* CEPs genes, regardless of the anchoring motif, reached up-to more than 76% of the wild-type *prtS* expression level. CEPs were sought and identified on the cell surface of LMD-9 wild-type strain, PrtH⁺ and PrtH⁺WANS mutants using shaving technique followed by peptide identification with tandem mass spectrometry, demonstrating that the heterologous secretion and anchoring of a protein of more than 200 kDa was efficient. The anchoring to the cell-wall seems to be more efficient when the LPXTG motif of PrtS was used instead of the S-layer motif of PrtH.

Conclusions: We demonstrated *S. thermophilus* LMD-9 could heterologously secrete a high molecular weight protein and probably covalently anchor it to the cell-wall.

Keywords: Heterologous expression, Secretion, Cell-wall anchored protein, *Streptococcus thermophilus* LMD-9, Cell envelope proteinase (CEP), PrtS, PrtH, *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 CIRM-BIA 103

* Correspondence: magali.genay@univ-lorraine.fr

¹Unité de Recherche Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux, Equipe Protéolyse et Biofonctionnalité des Protéines et des Peptides, Université de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy F-54506, France

²INRA, UR AFPA Unité Sous Contrat 340, Vandœuvre-lès-Nancy F-54506, France

Full list of author information is available at the end of the article

Background

Heterologous protein secretion is being increasingly employed to produce proteins on different living supports. Genetic tools have therefore been developed to present a protein or a peptide specifically on the surface of a microbial vector to study its structure, conformation, activity and/or interactions with its environment. Studies could be conducted in various conditions such as in a culture medium, in dairy matrix, or *in vivo*, for immune response (vaccination) or physiological effects in gastro intestinal tract [1,2]. In order to secrete heterologous proteins in the extracellular medium or anchor them to the cell-wall, the choice of the host is crucial and a panel of transformable species with their advantages and disadvantages is currently available [1]. The gram negative bacterium *Escherichia coli* is the most employed for intracellular heterologous expression, while the gram positive bacterium *Bacillus subtilis* is preferentially chosen for heterologous secretion [1,3]. *B. subtilis* also displays the advantage to be naturally competent. Indeed, it is possible in a one-step plasmid-free transformation to introduce into the cell and integrate in the chromosome by homologous recombination a foreign DNA. Lactic acid bacteria (LAB) have recently been used as alternative expression hosts to *B. subtilis* [4]. Among them, *Lactococcus lactis* presents several advantages, including many tools for genetic modifications, efficient protein secretion capability [4] and only few predicted cell surface proteins [5]. Furthermore, this bacterium possesses only one surface housekeeping protease, HtrA, able to degrade abnormal exported proteins and this protease gene can be inactivated to prevent the degradation of heterologously expressed proteins [4]. Finally, as this species has a generally recognised as safe (GRAS) status and is widely present in dairy products, it could be employed to study proteins behaviour in food (*in situ*) or *in vivo* which is not the case for *B. subtilis*. However, *Lc. lactis* still lacks the natural competence [6] in contrast to other food grade LAB [7] such as *Streptococcus thermophilus*.

S. thermophilus has a GRAS status and is widely used for its high acidification ability, in dairy products. This is one of the two dairy starters of yogurt and its recovery in faeces of human volunteers consuming yogurt has definitively established that this bacterium is capable to remain alive during its transit through the digestive tract [8,9]. Further, the production of active β -galactosidase in the second half of the small intestine by the strain FB13 further suggests that *S. thermophilus* remains metabolically active during its digestive transit. This could explain the improvement of lactose digestion observed in intolerant patients after yogurt consumption [9,10].

Previous works demonstrated that *S. thermophilus* was able to express intracellular heterologous proteins. Mutants were obtained by electrotransformation and plasmids were

used as gene vectors to produce intracellular heterologous proteins. For example, green fluorescent protein [11], *Streptomyces* cholesterol oxidase [12] and glutamate decarboxylase [13] were heterologously produced in *S. thermophilus* cytoplasm. The recent discovery of natural competence and its mechanisms in some *S. thermophilus* strains [14-16] allowed the introduction of heterologous genes in the bacterial cell by natural competence and their chromosomal insertion by double cross-over recombination. Since then, natural competence was used to insert linear DNA fragments corresponding to reporter genes such as the luciferase genes *luxAB* [17] and the antibiotic resistant genes, i.e. *cat* for chloramphenicol [17], *aphA3* for kanamycin or *ery* for erythromycin [18] which were intracellularly expressed. Now the challenge is to produce mutants able to export proteins on the cell surface and in this context, *S. thermophilus* LMD-9 could be a good candidate. Indeed, on the basis of its genome sequence, it is expected that this bacterium would display 2/3 less cell surface proteins than *Lc. lactis*, which already have few proteins present at the surface [5]. A single cell envelope proteinase (CEP), named PrtS, with high molecular weight is predicted to be covalently anchored onto the cell-wall by action of the sortase SrtA [19]. The secretion system exporting this CEP as well as the sortase SrtA could then be good candidates to secrete in the medium heterologous proteins of various molecular weights and to covalently anchor them onto the cell-wall. Further, as in the case of *Lc. lactis*, the presence of a unique housekeeping protease gene, *htrA*, is an advantage compared to *B. subtilis* that possesses multiple housekeeping proteases able to degrade the exported proteins at the surface [3], and *htrA* of *S. thermophilus* can be deleted to avoid protein degradation. Finally, *S. thermophilus* has been detected in human gut by metagenomic sequencing [20], further make possible the use of this bacterium in *in vivo* studies. Therefore, it could be interesting to further develop genetic tools to produce heterologous proteins on the cell-wall of *S. thermophilus* LMD-9 strain.

To make the proof of concept that *S. thermophilus* can be used as a tool for the heterologous secretion of cell-wall anchored proteins, we decided to heterologously express the *prtH* gene of *L. helveticus* CNRZ32 in *S. thermophilus* LMD-9. Indeed, one of the main topics of our laboratories is the study of the activity and specificity of CEPs of lactic acid bacteria, particularly those of *S. thermophilus* and *L. helveticus*. The choice of this protease seemed coherent to us knowing that: i) *S. thermophilus* and *L. helveticus* CEP genes present similarities in the codon usage; ii) both bacteria are used as co-starters in the manufacturing of Swiss-type cheeses and thus grow in the same environment (milk medium, temperature, pH ...), thereby eliminating a potential influence of the environment on the conformation and activity of PrtH; iii) *S. thermophilus* possesses an active

proteolytic system and so anything that seems necessary for the expression and activity of a protease; iv) proteolytic activity would be easy to detect as it is known to confer a growth advantage compared to strains that do not secrete a functional CEP [21,22]. Finally, this experiment may allow us to elucidate the specific role of PrtH in the proteolytic activity of *L. helveticus* CNRZ32 since four CEP genes were identified in its genome sequence designated as *prtH*, *prtH2*, *prtH3* and *prtH4* and the role of each CEP has not been defined independently yet [23,24].

Results

Strategy of the mutant constructions for the heterologous expression of PrtH on the cell-wall of *S. thermophilus* LMD-9

prtS of *S. thermophilus* and *prtH* of *L. helveticus* both encode high molecular weight proteins (above 180 kDa) secreted on the cell-wall and belonging to the subtilisin-like serine proteinase family. They display a similar organization, which can be separated into five regions important for our genetic constructions (Figure 1A and B): i) the promoter and the ribosome binding site (RBS); ii) the export signal with the signal sequence (S) which addresses the protein to the secretory system (Sec system); iii) the different CEP domains: pro-peptide domain (PP), catalytic domain (PR), A domain (A), B domain (B) only for *prtH* and helix domain (H); iv) the CEP fixation part consisting of a cell-wall spacer domain (W) and an anchor domain (AN) with a LPXTG anchoring motif for *prtS*, and of a cell-wall spacer domain (W) with a S-layer domain attachment at the C-terminal end for *prtH*; v) a stop codon at the end of the last domain followed by a transcription terminator [25,26]. Three main parameters should be considered to achieve PrtH secretion and anchoring: the signal sequence, the transcription level of the CEP and the anchoring motif. As *S. thermophilus* LMD-9 expresses an active CEP on its cell-wall, we have chosen to use the expression/secretion pathway of PrtS to express and secrete the CEP of *L. helveticus*. Thus, our strategy to secrete PrtH was to replace the pro-protein sequence of *prtS* of *S. thermophilus* LMD-9 with the pro-protein sequence of *prtH* of *L. helveticus* CNRZ32 (from the PP to the W domains), maintaining the promoter, RBS, and signal sequence of *prtS* (Figure 2A and B).

Regarding the signal sequence, the use of the PRED TAT tool [27] revealed that both CEPs PrtS and PrtH have a signal peptide which addresses them to the Sec system. In gram positive bacteria, this general secretion pathway seems to imply the presence of a peculiar amino acid sequence which follows the signal peptide and could be recognised by the secretory system as previously demonstrated in *Lc. lactis* [2]. As both PrtS and PrtH are predicted to be secreted by the Sec system, this peculiar sequence should be functional in both CEPs. Therefore, we assumed that this peculiar sequence, located at the

beginning of the PP domain of PrtH, would be functional in the Sec system of *S. thermophilus*. So only the S domain of PrtS was systematically conserved in our protein constructions to preserve the entire PP domain of PrtH in *S. thermophilus*.

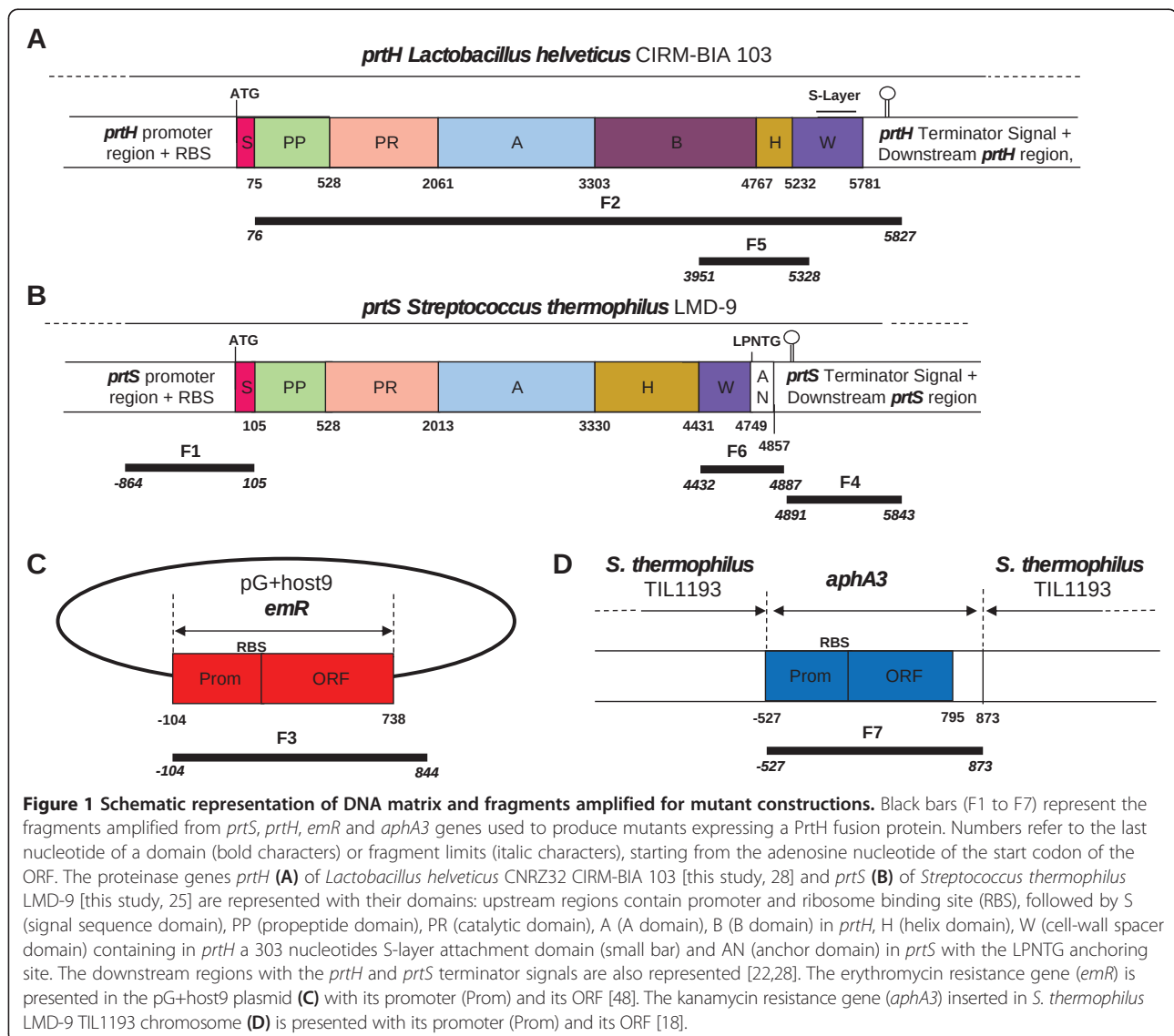
Concerning the anchoring, we decided to test two different cell-wall anchoring systems: either the one from PrtH (S-layer type) or that from PrtS (LPXTG). Indeed, the S-layer motif used by *L. helveticus* may be not adapted to the cell-wall of *S. thermophilus* and PrtH may not correctly interact with the cell-wall. Thus, to maximise the anchoring of the proteinase, we replaced its S-layer domain by the W and AN domains of PrtS.

Constructions of PrtH⁺, PrtH⁺WANS and PrtS⁻ mutants

In order to heterologously express PrtH on the cell-wall of *S. thermophilus* LMD-9, we constructed two mutants with two different anchoring systems (Figure 2). The mutant constructions were based on the design of an overlapping PCR (OL PCR) fragment to join the different gene parts, the natural transformation of *S. thermophilus* with the OL PCR resulting fragment and its integration into the chromosome by double cross-over recombination. The first mutant, named PrtH⁺, was expected to secrete PrtH which exhibited at the C-terminal of its W domain a S-layer anchoring motif, thought to anchor PrtH to the *L. helveticus* cell-wall [24,28] (Figure 2A). The 8622 base pair (bp) construction (F1 to F4) allowed the insertion of a 6718 bp foreign DNA by double cross-over recombination, replacing a large part of the *prtS* locus in *S. thermophilus* LMD-9 chromosome. As expected, the heterologous fused gene comprised the promoter, the RBS and the Signal sequence (S domain) of *prtS*, the *prtH* ORF spanning from the PP domain to 46 nucleotides (nt) downstream the stop codon, an erythromycin resistance gene and the downstream region of *prtS*.

The second mutant, named PrtH⁺WANS, derived from the first. The anchoring system of the PrtH⁺ mutant was replaced by the *prtS* cell-wall spacer and the anchor domains (W and AN domains) of *S. thermophilus* (Figure 2B and Methods). This was chosen to favour the secretion and the anchoring of the PrtH CEP in the cell-wall of *S. thermophilus* by covalent binding. Thus, a 4186 bp OL PCR fragment (Figure 2B; F5-F6-F7-F4) replaced by double cross-over recombination the *prtH* W domain (from the 97th nt of *prtH* W domain to the end of F3 fragment) by the F6 and F7 fragments.

During the construction of the PrtH⁺ mutant, one of the erythromycin resistant clones was lacking the *prtH* gene fragment (F2) (Figure 2C). In this mutant, called PrtS⁻, the major part of *prtS* was replaced by an 89 nt sequence and an erythromycin resistance gene, inserted between F1 and F4 fragments as described in the Methods section. This 89 nt sequence was produced

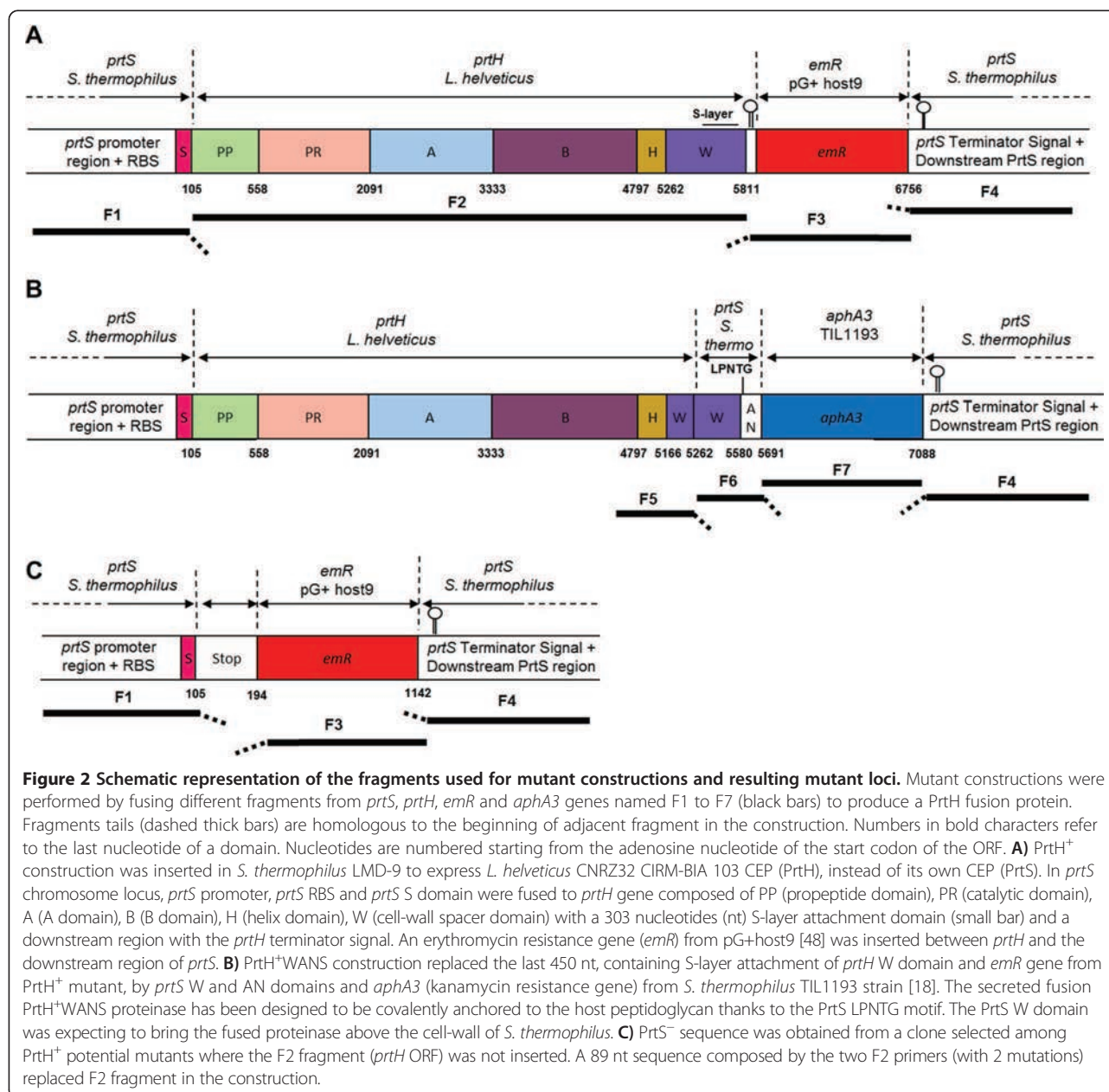


during the OL PCR amplification of *prtH*⁺ fragment by the fusion of F1 and F3 tail fragments. This sequence was composed of the beginning of *prtH* PP domain directly fused to the 3' region of F2 (after *prtH* stop codon). These two fragments had mutations (data not shown) and the resulting 48 aa residues peptide was composed of *prtS* S domain (MKKKETFSRLRYKIGTVSVLLGAVFLFAGAPS VAA) followed by 13 aa residues (KQQVKASVDSQTK) similar to the N-terminal aa residues of the PrtH PP domain with one mutation changing the first aa residue glutamate (E) of the PP into a lysine residue (K). As PrtS⁻ mutant was deprived of the major part of *prtS* and no other CEP genes were present in *S. thermophilus* LMD-9 genome, this mutant was used as a negative control in this study.

For the three constructed mutants, the constructions were checked by sequencing, which also confirmed that no additional or unexpected mutations occurred in the three mutant sequences.

Heterologous gene expressions

The transcription of *prtH*⁺ and *prtH*⁺WANS genes was investigated by real-time quantitative polymerisation chain reaction (RT-qPCR) during the exponential growth of *S. thermophilus* PrtH⁺ and PrtH⁺WANS in milk (Figure 3). This medium was use to maximise the CEP gene expression. Indeed, to grow at high cellular density in milk, which is poor in free amino acids and peptides, *S. thermophilus* requires an efficient CEP activity to hydrolyse caseins into peptides for nitrogen supply, and this activity



has been shown to be maximum during the exponential growth phase of the bacterium [29]. As expected, the *prtS*, *prtH*⁺ and *prtH*⁺WANS genes were expressed in *S. thermophilus* LMD-9 wild-type, *PrtH*⁺ mutant and *PrtH*⁺WANS mutant, respectively. When compared with the expression level of the *prtS* gene in the wild-type strain, the *prtH*⁺ and *prtH*⁺WANS genes appeared to be approximately 15% and 24% lower, respectively. No CEP gene expression was detected in the *PrtS*⁻ mutant.

Although CEP genes were expressed in *PrtH*⁺ and *PrtH*⁺WANS mutants, their growth in skim milk appeared to be very similar to that of the *PrtS*⁻ mutant.

These three mutants grew slightly lower than the wild-type strain LMD-9. Indeed, the three mutants reached an optical density at 480 nm (OD_{480 nm}) of 2 in five hours whereas the wild-type strain reached this OD in less than three hours. Additional activity tests were performed by using β- and α_{s1}- caseins as substrate as described by Sadat-Mekmene et al. [30]. No CEP activity was detected neither on the cell surface nor in the extracellular culture medium of the *PrtH*⁺ and *PrtH*⁺WANS mutants, whereas activity was detected for both wild-type strains *S. thermophilus* LMD-9 and *L. helveticus* CNRZ32 CIRM-BIA 103 (data not shown). However, as the strain CIRM-BIA 103

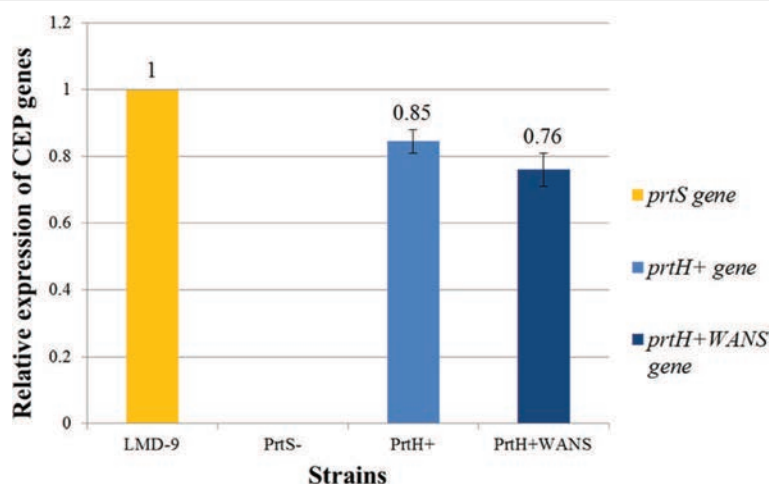


Figure 3 Relative expression of CEP genes in the mutants compared to *prtS* in *S. thermophilus* LMD-9. The expression of CEP genes (*prtS*, *prtH*⁺ and *prtH*⁺WANS) was detected by RT-qPCR of *S. thermophilus* wild-type LMD-9 and PrtS⁻, PrtH⁺ and PrtH⁺WANS mutant strains during the exponential growth phase in milk. CEP gene expressions were normalised with respect to the reference gene sigma70/sigma32 for each strain. The normalised expressions of *prtH*⁺ and *prtH*⁺WANS CEP genes were compared to that of the reference *prtS* gene.

contains 4 protease genes, the detected activity may be due to one or more proteases and not necessarily to PrtH.

Detection of the heterologous proteins expressed on the bacterial cell surface

To detect the presence of the various proteinases at the surface of *S. thermophilus* LMD-9 wild-type and mutant strains, a shaving approach was used. This method consists in hydrolysing the cell surface proteins of the living bacteria by trypsin under mild conditions, and in identifying the peptides released from the surface proteins using chromatographic separation coupled on line with tandem mass spectrometry. For each sample, negative controls without trypsin (cf. Methods) were performed. The identified proteins are reported in Additional file 1: shaving results A. The three CEPs PrtS, PrtH⁺ and PrtH⁺WANS were identified on the cell-wall of *S. thermophilus* LMD-9 wild-type strain, PrtH⁺ and PrtH⁺WANS mutants, respectively (Table 1 and Additional file 1: shaving results B, C and D). All detected peptides were specific to trypsin hydrolysis (which cuts after lysyl and arginyl amino acid residues), suggesting that these peptides did not result from degradation by another protease. To estimate the

coverage of each protein identified by LC-MS/MS experiments, the first step was to calculate the protein abundance index (PAI) which is the number of observed peptides divided by the number of observable peptides per protein. The second step was to calculate the exponentially modified protein abundance index (emPAI) from the PAI values as: $\text{emPAI} = 10^{\text{PAI}} - 1$. Although shaving is first of all a qualitative method, the emPAI allows a semi quantitative estimation of proteins regarding each sample separately [31,32].

The emPAI of CEPs among identified proteins in the sample was 112.92 for PrtS, 6.86 for PrtH⁺ and 161.66 for PrtH⁺WANS (Table 1). PrtS and PrtH⁺WANS were thus ranked among the most abundant proteins detected in their respective samples (Additional file 1: shaving results A). Those most abundant proteins were also predicted as cell surface proteins. So PrtH⁺WANS seemed to be present at the cell surface, probably anchored to the cell-wall as it is the case for PrtS. In contrast, PrtH⁺ appeared to be less abundant among the identified proteins. Identified CEP peptides are presented in Figure 4 and in Additional file 1: shaving results B, C and D. For PrtS, 60 peptides were identified from the PP to H domains, while no peptides

Table 1 Proteinases identified after cell surface shaving of *S. thermophilus* strains PrtS⁻, LMD-9, PrtH⁺ and PrtH⁺WANS

Description	Prot Id	MW (kDa)	PrtS ⁻		LMD-9		PrtH ⁺		PrtH ⁺ WANS	
			Nb id pept	emPAI	Nb id pept	emPAI	Nb id pept	emPAI	Nb id pept	emPAI
Subtilisin-like serine protease (PrtS)	Q03L35	172.9			60	112.92				
PrtH ⁺		208.6					40	6.86		
PrtH ⁺ WANS		206.0							82	161.66

emPAI: exponentially modified Protein Abundance Index [31].

Nb id pept: number of identified peptides belonging to identified protein.

Prot Id: Identification sequence from the following databases TrEMBL.

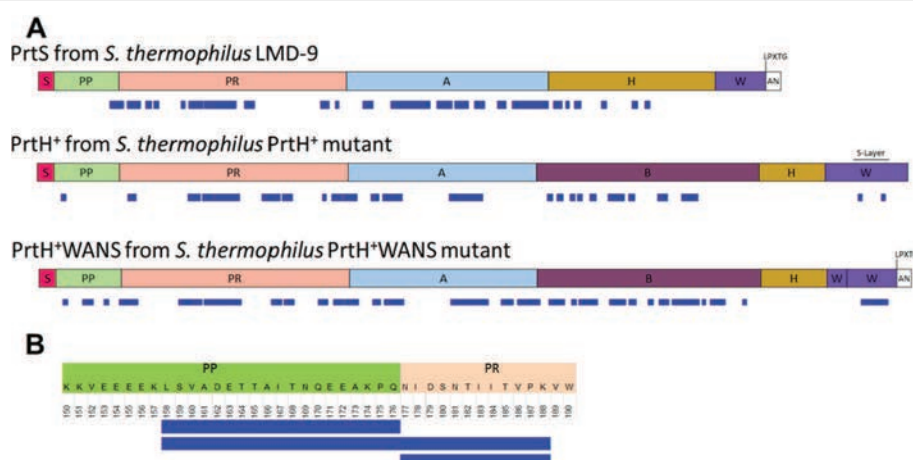


Figure 4 Schematic location of peptides identified from proteinase sequences after cell surface shaving. Cell surface proteins of *S. thermophilus* LMD-9, PrtH⁺, PrtH⁺WANS strains were hydrolysed by trypsin and peptides were identified by chromatography coupled on line with ESI quadrupole-orbitrap tandem mass spectrometry. **A.** Peptides corresponding to CEPs were aligned with PrtS, PrtH⁺ and PrtH⁺WANS protein sequences. Peptide sequences are represented with blue bars under the corresponding domains of CEPs: S, PP, PR, A, B, W and AN. **B.** Peptides identified (blue bars) around the cleavage site between PP and PR domains of *S. thermophilus* LMD-9 PrtS CEP. Amino acids and their position from the S domain of PrtS are indicated.

corresponded to the S, W or AN domains (Figure 4A and Additional file 1: shaving results B). For PrtH⁺, 40 peptides were identified from the PP to the W domains except from the H domain, while no peptides corresponded to the S domain (Figure 4A and Additional file 1: shaving results C). Finally, 82 peptides covering the PrtH⁺WANS sequence from the PP to the PrtS W domains were detected while no peptides originating from the S and AN domains of PrtS or from the H and W domains of PrtH were detected (Figure 4A and Additional file 1: shaving results D). As expected, no CEP was identified on the cell surface of the PrtS⁻ mutant.

Discussion

Although tools required for the expression of heterologous proteins in LAB have been recently developed [4], *B. subtilis* and *E. coli* remain the mostly employed bacteria [1,3]. However, the expression of proteins on the bacterial surface remains a challenge regardless the bacterial host because the final structure of the secreted protein is influenced by various parameters. For example, pH, temperature or ionic environment can impair the final conformation and subsequent function of the heterologous protein. Moreover, the cell-wall composition (peptidoglycan, S-layer, ...), which differed from one species to another [33,34], should influence the protein environment. Thus, enlarging the host panel to express heterologous proteins on the cell surface offers new choices between various secretion or cell-wall anchoring systems. LAB host can also be used as vectors in various milk derived products. To the best of our knowledge, this study reports for the first time the secretion to the cell-wall of a high molecular weight heterologous protein (above

200 kDa), i.e. the CEP PrtH of *L. helveticus*. Two mutants were constructed by natural transformation to secrete instead of the CEP PrtS of *S. thermophilus* LMD-9 wild-type strain, a PrtH (with its own S-layer attachment motif) and a PrtH⁺WANS protein (where the PrtH anchoring system was replaced by the PrtS one).

CEPs identification and location by shaving

To determine whether proteinases were really present on the cell surface, even at low level, we chose to shave the surface of the live cells of *S. thermophilus* wild-type and mutant strains by trypsin, a proteinase of well-known specificity, widely used in proteomics for protein identification by gel or gel-free based methods. This leads to the release of peptides from the cell surface proteins. This study presents, to the best of our knowledge, the first use of the shaving method on a *S. thermophilus* strain. The results have been very successful, not only because the shaving allowed us proving that the heterologous proteins were actually expressed but it also allowed detecting other proteins on the cell surface of the mutants and the wild-type strain. Forty-three proteins were thus identified. Searching their subcellular locations either by using the Uniprot data bank or by similarity to subcellular located proteins [35] revealed 17 proteins defined as cell surface (CS), or membrane-located (M) proteins, 22 cytoplasmic proteins and four uncharacterised proteins (Additional file 1: shaving results A). Only two cytoplasmic proteins were identified in all samples: the elongation factor Tu and the ATP-binding subunit of Clp protease and DnaK/DnaJ chaperones (Additional file 1: shaving results A). To estimate the abundance of each protein in each

sample compared to all detected proteins, we calculated the protein content in percent using the following formula: $((\text{emPAI of CS} + \text{M}) / \text{total emPAI}) \times 100$ [31]. Thus extracellular proteins (CS + M) represented 99.97%, 99.92%, 98.82% and 99.92% of all detected proteins for PrtS⁻ mutant, LMD-9, PrtH⁺ mutant and PrtH⁺WANS mutant, respectively.

The identification of few intracellular proteins, at a low level, is intrinsic to shaving [36] and can be explained either by a slight cell lysis during shaving leading to the release of intracellular proteins [37] or to the presence of moonlighting multitask proteins such as enolase [38].

Regarding the CEPs, PrtS, PrtH⁺ and PrtH⁺WANS were identified in shaving supernatants of *S. thermophilus* LMD-9 wild-type strain, PrtH⁺ mutant and PrtH⁺WANS mutant, respectively, while no CEP was identified for PrtS⁻ mutant strain (Table 1). As no signal peptide was identified, this suggests that the three CEPs were excreted through the Sec system, and consequently located on the cell-wall of *S. thermophilus*. So, if the first amino acids following the signal sequence are crucial for the translocation by the sec system (see "Strategy of the mutant constructions" in the Results part), we showed that the peculiar sequence present in PrtH of *L. helveticus* is functional in *S. thermophilus*. The wild-type strain *S. thermophilus* LMD-9 secretes PrtS CEP covalently anchored to the cell-wall [39]. This protein was highly abundant as shown by the high value of the emPAI (Table 1 and Additional file 1: shaving results A). This was also the case for PrtH⁺WANS, but not for PrtH⁺. This suggests that PrtH⁺WANS is probably covalently anchored to the cell-wall of *S. thermophilus* LMD-9, by the action of the sortase SrtA which recognizes the LPXTG motif, as it is the case for PrtS. Thus, the anchored system could be crucial for having highly abundant protein at the cell surface and it appears that the S-layer motif arising from *L. helveticus* strain seemed less adapted than the LPXTG motif to attach proteins to the cell-wall of *S. thermophilus*. Indeed, the emPAI of PrtH⁺ don't rank it among the most abundant proteins detected in its sample, contrary to PrtH⁺WANS (Additional file 1: shaving results A). This difference is also encountered with the number of identified peptides as 40 peptides were identified for CEP of PrtH⁺ mutant against 84 peptides for PrtH⁺WANS mutant (Figure 4A and Additional file 1: shaving results C and D). The lower number of PrtH⁺ identified peptides could be explained by a lower interaction of PrtH⁺ with the cell-wall leading to its higher release into the extracellular medium. Indeed, the absence of S-layer proteins surrounding the cell of *S. thermophilus* could have impaired the interaction between the W domain of PrtH and the peptidoglycan [33,34]. Actually, Hu et al. [40] showed that an excess of fusion green fluorescent protein (GFP) harbouring a S-layer motif incubated one hour with

S. thermophilus and *Lc. lactis* cells was able to be fixed on their surface but at low level compared to other LAB expressing S-layer proteins on their cell-wall.

Regarding the PrtS maturation, peptide LSVADET TAITNQEEAKPQ, corresponding to the C-terminal extremity of the PP domain, and peptide NIDSNTIITVPK to the N-terminal end of the PR domain were detected, which does not correspond to the theoretical cleavage sites for trypsin (Figure 4B). They could result from a cleavage between the last residue (Q) of the PP domain and the first residue (N) of the PR domain that occurs during the maturation process of PrtS, as shown by Fernandez-Espla et al. [25] and Chang et al. [41]. The concomitant presence of the complete sequence of the peptide LSVADETTAITN QEEAKPQNIDSNTIITVPK suggested that some PrtS molecules were also in their immature form, as stated by Chang et al. [41]. As both mature and immature forms were present at the cell surface, the maturation step could occur after the CEP anchoring.

CEP activity issues

The activity of PrtH⁺ and PrtH⁺WANS was neither detected at the cell surface of *S. thermophilus* nor in the medium. Moreover, cell-wall heterologous CEPs secreted in *S. thermophilus* mutants were not active on β and α_{s1} -caseins in contrast to the cells of wild-type strains of *L. helveticus* [30] and *S. thermophilus* LMD-9 (results not shown). This lack of activity could explain the difference of growth rate observed in milk between mutants and the wild-type strain. One hypothesis to explain the inactivity of the PrtH is the presence of a mutation in the gene sequence. Indeed, in this study, the strain *L. helveticus* CNRZ32 CIRM-BIA 103 was used (Accession: PRJEB1537; Taxonomy ID: 1226332) and the analysis of its *prtH* gene sequence revealed an unexpected difference compared to that of *L. helveticus* CNRZ32 *prtH* sequence previously published [GenBank: AF133727.1; GI: 5758038] although both strains derived from the same initial strain of the CNRZ collection. This difference consisted of a 83 aa residues imperfect duplication which overlaps the end of the H domain and the beginning of the W domain. This insertion, which extends twice the helix domain H, may change the conformation of the protein, the way it can be included in the cell wall or the environment around the catalytic domain PR. Previous works showed that the strains of *L. helveticus* CIRM-BIA 103 and CNRZ32 contain four protease genes, and showed a similar specific activity of the cell envelope proteinases [30], but it is not possible to know whether all CEPs are really active or only some of them.

A second hypothesis is that the heterologous PrtH could be immature. This was observed for PrtH⁺WANS mutant, with the identification of the peptide VYYANDSSADN MANVSTVWNNYK (Additional file 1: shaving results D)

which overlaps the PP and PR domains of PrtH⁺WANS CEP. In the case of *L. helveticus*, the maturation process could involve another actor to obtain a functional CEP. *L. helveticus* CNRZ32 has two maturation proteins in the chromosome belonging to the peptidylprolyl cis/trans isomerase family [23], named PrtM [UniProtKB/TrEMBL: A4UAD9] and PrtM2 [UniProtKB/TrEMBL: A4UAE0]. According to Broadbent et al. [23], PrtM could be required for PrtH maturation whereas PrtM2 should have a role in maturation of the other *L. helveticus* CEPs. Even if the maturation mechanism on *S. thermophilus* cell-wall is still not well established, this species does not seem to secrete maturase [5]. Maturation of PrtS could be achieved through an automaturation process or other factors not yet identified. One potential experiment to promote maturation of PrtH on the cell surface could be to introduce the *prtM* gene from *L. helveticus* CNRZ32 in PrtH⁺WANS mutant chromosome. However, this experiment requires multiple mutant constructions to expect to obtain active heterologous proteinases. Indeed, the expression level required to efficiently act on PrtH and the location and anchoring of PrtM on the bacterium surface are still ambiguous.

Finally, the lack of activity could be due to the chosen host and/or to the selected heterologous protein. Indeed, we cannot exclude that the microenvironment of the cell-wall (presence or absence of S-layer proteins) may influence the correct folding of the enzyme. This latter problem is also encountered in the other hosts commonly used for heterologous secretion. Furthermore, although PrtS activity on the cell-wall of *S. thermophilus* was demonstrated [29,41,42], the quantity of secreted proteins by this pathway is still unknown in *S. thermophilus* LMD-9 and heterologous CEPs as well as PrtS may be displayed at a too low level on the cell surface to detect the activity of heterologous CEPs. Anyway, despite the lack of activity, our tool actually allows secretion and anchoring of proteins of high molecular weight at the cell surface of *S. thermophilus*.

Conclusion

This study demonstrated that *S. thermophilus* LMD-9 strain is able to secrete and probably anchor heterologous proteins on its cell-wall and gives a new tool to enlarge the panel of heterologous secretion hosts. This *S. thermophilus* strain is a powerful tool regarding its ability for natural competence that allows bypassing plasmid construction to produce recombinant proteins. Moreover, its food grade status added to its wide industrial use and its ability to survive in gastrointestinal tract make *S. thermophilus* LMD-9 a good candidate to release recombinant proteins in a dairy matrix or directly in gastrointestinal tract. At this stage, our tool requires selection genes to be constructed which could constitute

a negative point in most applications. However, we can imagine to dispense with the use of a selection gene for further constructions, thanks to the highly transformation rate of *S. thermophilus* LMD-9 [14,15,17].

Methods

Bacterial strains and growth conditions

Strains used in this work were *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 CIRM-BIA 103, *Streptococcus thermophilus* LMD-9 [43], *S. thermophilus* LMD-9 TIL1193 [18] and three *S. thermophilus* LMD-9 mutants: PrtH⁺, PrtS⁻ and PrtH⁺WANS (this study). They were cultivated at 42°C, in MRS (Difco) for *L. helveticus* and in M17 supplemented with 2% of lactose (LM17) [44] for *S. thermophilus* strains. For natural transformation experiments, LM17 and reconstituted chemically defined medium (CDM) supplemented with 2% of lactose (LCDM) [45] were used. A 10% reconstituted skim milk was used for strain conservation and precultures of *S. thermophilus* strains. When necessary, antibiotics were added to the media: erythromycin (Sigma) at 5 µg.mL⁻¹ (for cultures of PrtH⁺ and PrtS⁻ mutants) or kanamycin (Sigma) at 1 mg.mL⁻¹ (for culture of PrtH⁺WANS mutant). The absorbance at 480 nm of skim milk cultures was measured after 1:10 dilution in a clarification solution of EDTA 0.2% (pH 12).

DNA extraction and PCR

General molecular biology techniques, DNA extraction and PCR amplifications were achieved according to Green and Sambrook [46], and/or supplier's recommendations. PCR fragments were obtained using the Taq DNA polymerase or the Phusion high fidelity DNA polymerase (Fermentas, Saint Rémy-lès-Chevreuse, France) in a Mastercycler proS (Eppendorf). All primers used in this work are listed in Table 2 and in Additional file 2: sequencing primers and Additional file 3: qPCR primers. They were designed by using Primer3Plus [47] and purchased from Eurogentec (Seraing, Belgium). To produce overlapping regions between adjacent fragments (see above), a short nucleotide sequence homologous to the beginning of the adjacent fragment was added at the 5' end of one of the primer used to amplify the desired fragment (in italics in Table 2).

For DNA constructions, each PCR fragment was first amplified with Phusion high fidelity DNA polymerase with the minimum of DNA matrix i.e. enough to have 500 to 1000 matrix copy per PCR reaction. PCR were performed according to polymerase supplier's recommendations. Fragments were then purified using high pure PCR product purification kit (Roche Applied Science, Meylan, France) and eluted in elution buffer as recommended by Fontaine et al. [17]. For both constructions produced by OL PCR, the four purified fragments were pooled in equal amount and PCR-amplified, in a final volume of 20 µL,

Table 2 Primers and resulting fragments used in overlap extension PCR for construction of PrtH⁺ and PrtH⁺WANS mutants

Fragment	Primer	Sequence (5' – 3')	Length (bp)	DNA matrix (strain)	Product size (kbp)	Hyb temp (°C)	Overlap product size (kbp)	Overlap hyb temp (°C)
PrtH ⁺								
F1	Style 1-1*	ACAAATTCATGCCGTTCATAAG	22	gDNA (LMD-9)	0.986	59.5		
	PrtSssUp(H)_R	GCCTTAACTGTGTTCTGCAGCTACCGATGGTGC	35					
F2	PrtHpp_F	GAACAACAAGTTAAGGCTAGTGTGACAGCCAAACAAAAC	41	gDNA (CNRZ32 CIRM-BIA 103)	5.752	62	8.622	55
	PrtHterm_R	AAAAGAGTAATGATCCTTCTCATTACTCTTTCATTATATGTAAATG ATTATTTTAC	56					
F3	EmpG9(H)_F	GAGAAGGATCATTACTCTTTTCAAACCTTAAGAGTGTGTGATAGTGC	47	pG+host 9	0.969	59.5		
	EmpG9_R	GGACCTCTTTAGCTCCTTGG	20					
F4	PrtSDn(Em)_F	CCAAGGAGCTAAAGAGGTCCATAATAAAACCGCTTAATCATTGTG	45	gDNA (LMD-9)	0.973	49		
	PrtSDn_R	CGTCTATCAATCTTGATTTTCTTG	25					
PrtH ⁺ WANS								
F5	UpH_F	CGGTATCAAGTGGGGTACTCG	21	gDNA (PrtH+)	1.395	69		
	UpH(WANS)_R	CTTGCTTGGCTTGAGAAACAGGAGCTGCAACTTGGTTATC	41					
F6	WANS_F	TCTGCAAGCCAAGCAAG	17	gDNA (LMD-9)	0.473	58	4.186	55
	WANS(aphA3)_R	CTCAAATGGTTCGCTGGTTAGCAAACCTGTGATAAAGC	38					
F7	aphA3_F**	CCAGCGAACCATTTGAG	17	gDNA (TIL1193)	1.4	54		
	aphA3_R**	GTTGCGGATGTACTTCAG	18					
F4	PrtSDn(aphA3)_F	CTGAAGTACATCCGCAACATAATAAAACCGCTTAATCATTGTG	43	gDNA (LMD-9)	0.971	61.7		
	PrtSDn_R	CGTCTATCAATCTTGATTTTCTTG	25					

Primers Style 1-1, PrtSDn_R, and UpH_F correspond to those used for overlapping PCR reaction and italicised nucleotides correspond to homologous tails. The name, sequence, length, DNA matrix, product size (including the added tails), hybridization temperature (hyb temp), overlap product size and overlap hybridisation temperature (hyb temp) are indicated. bp (base pairs); kbp (kilobase pairs) and gDNA (genomic DNA) *[42], **[18].

with the forward primer of the 5' end fragment and the reverse primer of the 3' end fragment (Table 2). For sequencing, PCR fragments were amplified with the Taq polymerase and sequencing primers (Additional file 2: sequencing primers) and shipped to the company Beckman Coulter Genomics (Essex, U.K.).

Genetic material and mutant constructions

Four DNA matrices were used for mutant constructions: the *prtH* gene [locus_tag: LHCIRMBIA103_00753; NCBI Accession Number: PRJEB1537; Taxonomy ID: 1226332] of *L. helveticus* CNRZ32 CIRM-BIA 103 (Figure 1A), the *prtS* gene [locus tag: STER_0846; NCBI Reference Sequence: YP_820283.1; GI: 116627664] from *S. thermophilus* LMD-9 (Figure 1B), the erythromycin resistance gene (Figure 1C) from pG+host9 plasmid DNA [48] and the kanamycin resistance gene (Figure 1D) from *S. thermophilus* LMD-9 TIL1193 genomic DNA (gDNA) [18].

Two constructions were obtained using OL PCR. Primers used for OL PCR are described in Table 2. The *prtH*⁺ 8622 bp construction was produced by assembling 4 fragments in this order: F1, F2, F3 and F4 (Figure 2). For F1 and F4 respectively, a 969 bp sequence composed of the promoter, RBS, and S domain of *prtS* and the 953 bp downstream region of *prtS* fragment starting 33 nt after *prtS* stop codon were amplified from *S. thermophilus* LMD-9 gDNA (Figure 1B). For F2, a 5752 bp region of the *prtH* open reading frame (ORF) sequence, from PP to 46 nt after stop codon was amplified from *L. helveticus* CNRZ32 CIRM-BIA 103 gDNA (Figure 1A). For F3, a 948 bp sequence (Figure 1C) containing an erythromycin resistance gene was amplified from pG+host9 plasmid DNA [48].

The *prtH*⁺WANS 4186 bp construction results from the assembly of 4 fragments F5, F6, F7 and F4 (Figure 2B). For F5, a 1378 bp region composed of the last 817 nt of B domain, the H domain and the first 96 nt of W domain of *prtH* excluding the S-layer sequence was amplified from *L. helveticus* CNRZ32 CIRM-BIA 103 gDNA (Figure 1A). For F6, a 456 bp sequence with W and AN domains of *prtS* plus 30 nt after *prtS* stop codon was amplified from *S. thermophilus* LMD-9 gDNA (Figure 1B). For F7, a 1400 bp sequence of kanamycin resistance gene (Figure 1D) was amplified from *S. thermophilus* LMD-9 TIL1193 gDNA [18]. The F4 region was the same as the one used for PrtH⁺ construction.

Natural transformation

Linear DNA fragments obtained by OL PCR were introduced in *S. thermophilus* LMD-9 by natural transformation as described by Gardan et al. [18]. Briefly, *S. thermophilus* LMD-9 was grown at 42°C in chemically defined medium (CDM) during 5–6 hours, until OD_{600 nm} = 1.8–2 (exponential growth phase). Culture was then diluted in CDM

in order to obtain OD_{600 nm} = 0.05 and incubated at 42°C about 1 hour, until OD_{600 nm} reached 0.2. Then, 100 µL of culture was mixed with 3 µL of OL PCR product and incubated 30 min at 42°C. After the adding of 900 µL of LM17, the mixture was re-incubated 40 min at 42°C. Cells were then concentrated 10 times by centrifugation (5 min, 3900 g) and resuspension with their own supernatant, and spread on LM17 agar plates supplemented with the appropriate antibiotic.

The *prtH*⁺ OL PCR fragment was introduced into *S. thermophilus* LMD-9 to obtain a PrtH⁺ mutant. Likewise, the *prtH*⁺WANS OL PCR fragment was introduced in the PrtH⁺ mutant to obtain the PrtH⁺WANS mutant. Integration of OL PCR fragments at the targeted locus is achieved through the presence of 2 fragments of approximately 1000 bp homologous to the targeted locus and surrounding the foreign DNA. These homologous regions were included into the F1 or F5, and F4 fragments (Figures 1 and 2).

RNA extraction, reverse transcription and quantitative real-time PCR

S. thermophilus LMD-9, PrtS[−], PrtH⁺ and PrtH⁺WANS were grown in skim milk up-to OD_{480 nm} = 1–2 (exponential growth phase), before milk coagulation. Milk caseins were removed according Chopard et al. [49]: at 6 mL of skim milk culture were added 795 µL of saline solution (NaCl 0.85% (wt/v); sodium glycerophosphate 0.5% (wt/v); tween 80 0.1% (v/v); pH 7) and 195 µL of trisodium citrate solution 1 M. The cell pellets were harvested by centrifugation (15 min, 3900 g at 4°C) and a second washing with the same solutions was done. The following step was performed using the RNA extract Kit Aurum (Bio-Rad, Marnes La Coquette, France) and cell lysis step was modified as follows: to improve cell lysis, an ultrasonic bath (Bioruptor, Diagenode, Liège, Belgium) (15 s 4 times at maximal power) was performed twice. An additional mechanic milling with 250 mg of Ø 0.1 – 0.25 mm glass beads (Fisher Scientific, Illkirch, France) was also performed in 2 mL microtubes by vortexing first 60 s then twice 30 s, with at least 2 min stay on ice between each milling. The supernatant was collected after centrifugation at 12,000 g for 1.5 min at room temperature.

After nucleic acids extraction, two DNase steps were performed: a first step with DNase I (Bio-Rad) followed by a phenol-chloroform extraction [46] and a second step with RNase-free DNase I (Ambion, Courtaboeuf, France). The last step was repeated until PCR control with sigma70 primers was negative after 30 PCR cycles [42]. Total RNA concentrations were determined by measuring the absorbance at 260 nm using a spectrophotometer Nanodrop-1000 (Thermo Scientific, Illkirch, France). Complementary DNAs (cDNA) were synthesized from 1 µg of RNA by using Moloney

murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen, Saint Aubin, France) according to the manufacturer's instructions.

Quantitative PCR (qPCR) reactions were performed on CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Biorad) following manufacturer's instructions. qPCR primers were designed with Primer3Plus software [47] to amplify approximately 130 bp fragments of: *sigma70/sigma32* (reference gene), *prtS* (positive control) and *prtH* (Additional file 3: qPCR primers). Serial dilutions of each cDNA sample (LMD-9, PrtH⁺ and PrtH⁺WANS) were carried out to check efficiency of each primer pair and obtain standard curves ($C_t = f(\log \text{ initial cDNA concentration})$). Relative quantities were obtained after comparing to the standard curves and normalized using the following formula: $R = (\text{relative quantity of gene of interest}) / (\text{relative quantity of reference gene})$. Ratios obtained for *prtH* gene in PrtH⁺ and PrtH⁺WANS mutants were then compared to that of *prtS* gene in LMD-9. Quantification was carried out twice independently and the mean and SEM (Standard Error of Mean) were determined.

Surface tryptic digestion of live cells (shaving)

S. thermophilus LMD-9 wild-type and the three mutants were grown at 42°C in 50 mL of 10% reconstituted skim milk to $OD_{480 \text{ nm}} = 2$ (exponential growth phase). Cells were washed first in tri-sodium citrate solution 0.25 M (Carlo Erba, Val de Reuil, France) and centrifuged at 500 g, 10 min at 4°C. The supernatants containing bacterial cells were then centrifuged at 8,000 g, 10 min at 4°C and washed at least three times with 100 mM Tris-HCl, pH 7.5 containing 150 mM NaCl to remove the residual caseins. Washed cells were concentrated to $OD_{650 \text{ nm}} = 30$ and suspended in PBS containing 5 mM DL-Dithiothreitol (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) solution, adjusted to pH 8.5. Five µg of sequenced grade trypsin (Promega, Charbonnières, France) were added to 500 µL of the concentrated cell solution. In parallel, negative controls were carried out by adding the trypsin buffer without the enzyme. Cells were incubated 1 hour at 37°C with shaking (180 rpm). Supernatants were harvested by centrifugation at 10,000 g, 10 min at room temperature and filtrated through a 0.45 µm filter (Millex PVDF, 13 mm, Millipore, Molsheim, France). Supernatants were incubated overnight at 37°C with shaking (100 rpm) in presence of 1 µg of trypsin. The reaction was stopped by adding 15 µL TriFluoroacetic Acid (TFA) 10% (v/v) (Sigma Aldrich) and samples were stored at -20°C before mass spectrometry analysis.

Tandem mass spectrometry

Mass spectrometry (MS) experiments were performed using a nanoRSLC Dionex U3000 system fitted to a Q Exactive mass spectrometer (Thermo Scientific, San Jose,

USA) equipped with a nanoelectrospray ion source. A preliminary sample concentration step was performed on a nanotrap PepMap 100 (C18, 3 µm, 75 µm Inner Diameter (ID) × 20 mm Length (L)) (Dionex, Amsterdam, Netherlands). Separation was performed on a reverse-phase column PepMap RSLC C18 3 µm, 100 Å (75 µm ID, 150 mm L) (Dionex, Amsterdam, Netherlands) at 35°C, using solvent A (2% (v/v) acetonitrile, 0.08% (v/v) formic acid and 0.01% (v/v) TFA in deionized water) and solvent B (95% (v/v) acetonitrile, 0.08% (v/v) formic acid and 0.01% (v/v) TFA in deionized water). 5-60% of solvent B in 46 min and 60-80% in 1 min was applied as separation gradient at a flow rate of 0.3 µL/min. Eluted peptides were directly electrosprayed into the mass spectrometer operated in positive mode and a voltage of 2 kV with the help of a Proxeon Nanospray Flex ion source (Thermo Scientific, San Jose, USA). Spectra were recorded in full MS mode and selected in a mass range 300–2000 *m/z* for MS spectra with a resolution of 70,000 at *m/z* 200. For each scan, the ten more intense ions were selected for fragmentation. MS/MS spectra were recorded with a resolution of 17,500 at *m/z* 200 and the parent ion was subsequently excluded of the analysis during 15 s. The instrument was externally calibrated according to the supplier's procedure.

To identify peptides, all data (MS and MS/MS) were submitted to X! Tandem using the X! Tandem pipeline developed by PAPPISO (Plateforme d'Analyse Protéomique de Paris Sud-Ouest (PAPPISO), INRA, Jouy-en-Josas, France, <http://pappiso.inra.fr>).

The search was performed against a database composed of the taxonomy Bacilli from www.uniprot.org (Taxon identifier: 91061) to which was added the deduced sequences of the two proteins of PrtH⁺ and PrtH⁺WANS. Database search parameters were specified as follows: trypsin cleavage was used and the peptide mass tolerance was set to 10 ppm for MS and 0.02 Da for MS/MS. Oxidation of methionine was selected as a variable modification. Semi-tryptic peptides were allowed during the "refinement" process of X!tandem. For each peptide identified, a minimum score corresponding to an e-value below 0.05 was considered as a prerequisite for peptide validation.

The identified proteins were conserved when at least three specific peptides were identified.

Additional files

Additional file 1: Proteins identified after cell surface shaving of *S. thermophilus* strains PrtS⁺, LMD-9, PrtH⁺ and PrtH⁺WANS.

Additional file 2: Sequencing primers.

Additional file 3: Primers used for qPCR experiments.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

XL carried out the experiments and contributed to the redaction of the manuscript. VG supervised shaving experiments and results analysis and contributed to the redaction. VBB provided technical assistance for mass spectrometry. JJ provided experience and knowledge for mass spectrometry. SL initiated this work and corrected the manuscript. AD initiated and supervised this work. MG supervised the project and contributed to the redaction of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. Rozenn GARDAN for her advices in CDM and natural transformation methods, Dr. Wessam GALIA for his help in qPCR data analysis and Dr. Gwenael JAN for his help in shaving method. We also thank Dr. Zeeshan HAFEEZ for his language corrections. *L. helveticus* CNRZ32 CIRM-BIA 103 was kindly provided by the Centre International de Ressources Microbiennes-Bactéries d'Intérêt Alimentaire, INRA, Rennes, France. Xavier LECOMTE is the recipient of a Ph.D. fellowship from the "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche". This work was financially supported by the Région Lorraine and the Région Bretagne.

Author details

¹Unité de Recherche Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux, Equipe Protéolyse et Biofonctionnalité des Protéines et des Peptides, Université de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy F-54506, France. ²INRA, UR AFPA Unité Sous Contrat 340, Vandœuvre-lès-Nancy F-54506, France. ³UMR 1253, INRA, Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, Rennes, France. ⁴UMR 1253, Agrocampus Ouest, Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, Rennes, France.

Received: 10 January 2014 Accepted: 27 May 2014

Published: 5 June 2014

References

- Bernaudeau F, Frelet-Barrand A, Pochon N, Dementin S, Hivin P, Boutigny S, Rioux JB, Salvi D, Seigneurin-Berny D, Richaud P, Joyard J, Pignol D, Sabaty M, Desnos T, Pebay-Peyroula E, Darrouzet E, Vernet T, Rolland N: **Heterologous expression of membrane proteins: choosing the appropriate host.** *PLoS One* 2011, **6**(12):e29191.
- Le Loir Y, Azevedo V, Oliveira SC, Freitas DA, Miyoshi A, Bermudez-Humaran LG, Nouaille S, Ribeiro LA, Leclercq S, Gabriel JE, Guimaraes VD, Oliveira MN, Charlier C, Gautier M, Langella P: **Protein secretion in *Lactococcus lactis*: an efficient way to increase the overall heterologous protein production.** *Microb Cell Fact* 2005, **4**:2.
- Westers L, Westers H, Quax WJ: ***Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism.** *Biochim Biophys Acta-Mol Cell Res* 2004, **1694**:299–310.
- Morello E, Bermudez-Humaran LG, Llull D, Sole V, Miraglio N, Langella P, Poquet I: ***Lactococcus lactis*, an efficient cell factory for recombinant protein production and secretion.** *J Mol Microbiol Biotechnol* 2008, **14**:48–58.
- Zhou MM, Theunissen D, Wels M, Siezen RJ: **LAB-Secretome: a genome-scale comparative analysis of the predicted extracellular and surface-associated proteins of Lactic Acid Bacteria.** *BMC Genomics* 2010, **11**:651.
- Wydaŭ S, Dervyn R, Anba J, Ehrlich SD, Maguin E: **Conservation of key elements of natural competence in *Lactococcus lactis* ssp.** *FEMS Microbiol Lett* 2006, **257**:32–42.
- Johnsborg O, Eldholm V, Havarstein LS: **Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function.** *Res Microbiol* 2007, **158**:767–778.
- Elli M, Callegari ML, Ferrari S, Bessi E, Cattivelli D, Soldi S, Morelli L, Feuillerat NG, Antoine JM: **Survival of yogurt bacteria in the human gut.** *Appl Environ Microbiol* 2006, **72**:5113–5117.
- Mater DDG, Bretigny L, Firmesse O, Flores MJ, Mogenet A, Bresson JL, Corthier G: ***Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* survive gastrointestinal transit of healthy volunteers consuming yogurt.** *FEMS Microbiol Lett* 2005, **250**:185–187.
- Guarner F, Perdigon G, Corthier G, Salminen S, Koletzko B, Morelli L: **Should yoghurt cultures be considered probiotic?** *Br J Nutr* 2005, **93**:783–786.
- Solaiman DKY, Somkuti GA: **Construction of a green-fluorescent protein-based, insertion-inactivation shuttle vector for lactic acid bacteria and *Escherichia coli*.** *Biotechnol Lett* 1997, **19**:1175–1179.
- Somkuti GA, Solaiman DKY, Johnson TL, Steinberg DH: **Transfer and expression of *A streptomyces* cholesterol oxidase gene in *Streptococcus thermophilus*.** *Biotechnol Appl Biochem* 1991, **13**:238–245.
- Renye JA, Somkuti GA: **Vector-mediated chromosomal integration of the glutamate decarboxylase gene in *Streptococcus thermophilus*.** *Biotechnol Lett* 2012, **34**:549–555.
- Blomqvist T, Steinmoen H, Havarstein LS: **Natural genetic transformation: a novel tool for efficient genetic engineering of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*.** *Appl Environ Microbiol* 2006, **72**:6751–6756.
- Fontaine L, Dandoy D, Boutry C, Delplace B, De Frahan MH, Fremaux C, Horvath P, Boyaval P, Hols P: **Development of a versatile procedure based on natural transformation for marker-free targeted genetic modification in *Streptococcus thermophilus*.** *Appl Environ Microbiol* 2010, **76**:7870–7877.
- Fontaine L, Goffin P, Dubout H, Delplace B, Baulard A, Lecat-Guillet N, Chambellon E, Gardan R, Hols P: **Mechanism of competence activation by the ComRS signalling system in streptococci.** *Mol Microbiol* 2013, **87**:1113–1132.
- Fontaine L, Boutry C, De Frahan MH, Delplace B, Fremaux C, Horvath P, Boyaval P, Hols P: **A novel pheromone quorum-sensing system controls the development of natural competence in *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*.** *J Bacteriol* 2010, **192**:1444–1454.
- Gardan R, Besset C, Guillot A, Gittion C, Monnet V: **The oligopeptide transport system is essential for the development of natural competence in *Streptococcus thermophilus* Strain LMD-9.** *J Bacteriol* 2009, **191**:4647–4655.
- Goh YJ, Goin C, O'Flaherty S, Altermann E, Hutkins R: **Specialized adaptation of a lactic acid bacterium to the milk environment: the comparative genomics of *Streptococcus thermophilus* LMD-9.** *Microb Cell Fact* 2011, **10**(Suppl 1):S22.
- Qin JJ, Li RQ, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li JH, Xu JM, Li SC, Li DF, Cao JJ, Wang B, Liang HQ, Zheng HS, Xie YL, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, et al: **A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing.** *Nature* 2010, **464**:U59–U70.
- Dandoy D, Fremaux C, De Frahan MH, Horvath P, Boyaval P, Hols P, Fontaine L: **The fast milk acidifying phenotype of *Streptococcus thermophilus* can be acquired by natural transformation of the genomic island encoding the cell-envelope proteinase PrtS.** *Microb Cell Fact* 2011, **10**(Suppl 1):S21.
- Sadat-Mekmene L, Genay M, Atlan D, Lortal S, Gagnaire V: **Original features of cell-envelope proteinases of *Lactobacillus helveticus*. A review.** *Int J Food Microbiol* 2011, **146**:1–13.
- Broadbent JR, Cai H, Larsen RL, Hughes JE, Welker DL, De Carvalho VG, Tompkins TA, Ardo Y, Vogensen F, De Lorentis A, Gatti M, Neviani E, Steele JL: **Genetic diversity in proteolytic enzymes and amino acid metabolism among *Lactobacillus helveticus* strains.** *J Dairy Sci* 2011, **94**:4313–4328.
- Genay M, Sadat L, Gagnaire V, Lortal S: ***prtH2*, not *prtH*, is the ubiquitous cell-wall proteinase gene in *Lactobacillus helveticus*.** *Appl Environ Microbiol* 2009, **75**:3238–3249.
- Fernandez-Esplá MD, Garault P, Monnet V, Rul F: ***Streptococcus thermophilus* cell wall-anchored proteinase: release, purification and biochemical and genetic characterization.** *Appl Environ Microbiol* 2000, **66**:4772–4778.
- Siezen RJ: **Multi-domain, cell-envelope proteinases of lactic acid bacteria.** *Antonie Van Leeuwenhoek* 1999, **76**:139–155.
- Bagos PG, Nikolaou EP, Liakopoulos TD, Tsigiris KD: **Combined prediction of Tat and Sec signal peptides with hidden Markov models.** *Bioinformatics* 2010, **26**:2811–2817.
- Pederson JA, Mileski GJ, Weimer BC, Steele JL: **Genetic characterization of a cell envelope-associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32.** *J Bacteriol* 1999, **181**:4592–4597.
- Shahbal S, Hemme D, Renault P: **Characterization of a cell envelope-associated proteinase activity from *Streptococcus thermophilus* H-strains.** *Appl Environ Microbiol* 1993, **59**:177–182.
- Sadat-Mekmene L, Jardin J, Corre C, Mollé D, Richoux R, Delage MM, Lortal S, Gagnaire V: **Simultaneous presence of PrtH and PrtH2 proteinases in *Lactobacillus helveticus* Strains improves breakdown of the pure alphas1-casein.** *Appl Environ Microbiol* 2011, **77**:179–186.
- Ishihama Y, Oda Y, Tabata T, Sato T, Nagasu T, Rappsilber J, Mann M: **Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation**

- of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol Cell Proteomics* 2005, **4**:1265–1272.
32. Rappsilber J, Ryder U, Lamond AI, Mann M: **Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome.** *Genome Res* 2002, **12**:1231–1245.
 33. Delcour J, Ferain T, Deghorain M, Palumbo E, Hols P: **The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria.** *Antonie Van Leeuwenhoek* 1999, **76**:159–184.
 34. Schleifer KH, Kandler O: **Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications.** *Bacteriol Rev* 1972, **36**:407–477.
 35. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden TL: **BLAST plus: architecture and applications.** *BMC Bioinforma* 2009, **10**:421.
 36. Solis N, Larsen MR, Cordwell SJ: **Improved accuracy of cell surface shaving proteomics in *Staphylococcus aureus* using a false-positive control.** *Proteomics* 2010, **10**:2037–2049.
 37. Olaya-Abril A, Gomez-Gascon L, Jimenez-Munguia I, Obando I, Rodriguez-Ortega MJ: **Another turn of the screw in shaving Gram-positive bacteria: Optimization of proteomics surface protein identification in *Streptococcus pneumoniae*.** *J Proteomics* 2012, **75**:3733–3746.
 38. Henderson B, Martin A: **Bacterial virulence in the moonlight: Multitasking bacterial moonlighting proteins are virulence determinants in infectious disease.** *Infect Immun* 2011, **79**:3476–3491.
 39. Marraffini LA, Dedent AC, Schneewind O: **Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2006, **70**:192–221.
 40. Hu SM, Kong J, Sun ZL, Han LL, Kong WT, Yang P: **Heterologous protein display on the cell surface of lactic acid bacteria mediated by the s-layer protein.** *Microb Cell Fact* 2011, **10**:86.
 41. Chang OK, Perrin C, Galia W, Saulnier F, Miclo L, Roux E, Driou A, Humbert G, Dary A: **Release of the cell-envelope protease PrtS in the growth medium of *Streptococcus thermophilus* 4 F44.** *Int Dairy J* 2012, **23**:91–98.
 42. Galia W, Perrin C, Genay M, Dary A: **Variability and molecular typing of *Streptococcus thermophilus* strains displaying different proteolytic and acidifying properties.** *Int Dairy J* 2009, **19**:89–95.
 43. 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 DM, Hawkins T, Plengvidhya V, Welker D, Hughes J, Goh Y, Benson A, Baldwin K, Lee JH, Diaz-Muniz I, Dosti B, Smeianov V, Wechter W, Barabote R, et al: **Comparative genomics of the lactic acid bacteria.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:15611–15616.
 44. Terzaghi BE, Sandine WE: **Improved medium for lactic *Streptococci* and their bacteriophages.** *Appl Microbiol* 1975, **29**:807–813.
 45. Letort C, Juillard V: **Development of a minimal chemically-defined medium for the exponential growth of *Streptococcus thermophilus*.** *J Appl Microbiol* 2001, **91**:1023–1029.
 46. Green MR, Sambrook J: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012.
 47. Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JAM: **Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3.** *Nucleic Acids Res* 2007, **35**:W71–W74.
 48. Maguin E, Prevost H, Ehrlich SD, Gruss A: **Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other gram-positive bacteria.** *J Bacteriol* 1996, **178**:931–935.
 49. Chopard MA, Schmitt M, Perrera E, Chamba JF: **Qualitative aspect of proteolytic activity of thermophilic lactobacilli using in Swiss cheeses.** *Lait* 2001, **81**:183–194.

doi:10.1186/1475-2859-13-82

Cite this article as: Lecomte et al.: The naturally competent strain *Streptococcus thermophilus* LMD-9 as a new tool to anchor heterologous proteins on the cell surface. *Microbial Cell Factories* 2014 **13**:82.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- **Convenient online submission**
- **Thorough peer review**
- **No space constraints or color figure charges**
- **Immediate publication on acceptance**
- **Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar**
- **Research which is freely available for redistribution**

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Additional files

Additional file 1

A. Proteins identified after cell surface shaving of *S. thermophilus* strains PrtS⁻, LMD-9, PrtH⁺ and PrtH⁺WANS.

Description	Prot Id	MW (kDa)	Location	PrtS ⁻		LMD-9		PrtH ⁺		PrtH ⁺ WANS	
				Nb id pept	emPAI	Nb id pept	emPAI	Nb id pept	emPAI	Nb id pept	emPAI
Subtilisin-like serine protease (PrtS)	Q03L35	172.9	CS			60	112.92				
PrtH ⁺		208.6	CS					40	6.86		
PrtH ⁺ WANS		206.0	CS							82	161.66
Possible cell surface protein (STER_0576)	Q03LS6	108.3	CS	38	104.64	7	0.64	36	34.29	37	32.40
5'-nucleotidase/2'.3'-cyclic phosphodiesterase or related esterase (STER_0198)	Q03MQ2	91.1	CS	50	108 901.26	14	3.64	45	12914.50	47	39136.47
Surface antigen (STER_0478 = Cell separation envelope protein Cse)	Q03M12	50.4	CS	3	999.00	6	31621.78	5	31621.78	4	9999.00
Surface antigen (STER_0042)	Q03N07	46.4	CS	5	9.00	3	2.16	6	12.34	6	9.00
Aggregation promoting factor related surface protein (STER_1982)	Q03I85	19.8	CS	7	36.28	6	25.83			5	9.00
Enolase (eno)	Q03LI0	46.9	CS/Cyto			7	1.23	3	0.35		
ABC-type oligopeptide transport system (STER_1411)	Q03JP7	72.1	CS	25	42.94	29	33.33	24	23.71	47	9209.55
ABC-type oligopeptide transport system (STER_1409)	Q03JP9	71.7	CS	21	17.17	27	26.83	24	20.54	38	1290.55
Trypsin-like serine protease (STER_2002 = htrA)	Q03I68	42.7	CS					5	2.83	5	2.83
ABC-type Fe3+-hydroxamate transport system (STER_1025)	Q03KN8	37.9	CS	5	1.25					3	0.50
Uncharacterized ABC-type transport system (STER_0856)	Q03L27	37.5	CS			4	1.15			9	4.62
ABC-type amino acid transport/signal transduction system (STER_1539)	Q03JD1	31.2	CS					5	3.22		
ABC-type amino acid transport/signal transduction system (STER_1619)	Q03J56	30.6	CS	5	1.89						
ABC-type amino acid transport/signal transduction system (STER_1455)	Q03JK6	29.3	CS					3	0.70	5	1.42
ABC-type amino acid transport/signal transduction system (STER_1452)	Q03JK9	28.2	CS							4	1.03
Na+/xyloside symporter or related transporter (STER_1367)	Q03JT2	69.1	M			3	0.64				
High-affinity Fe2+/Pb2+ permease(STER_1022)	Q03KP1	61.0	M	6	1.96	9	6.63	8	2.38	10	7.73

Pyruvate-formate lyase(STER_1622)	Q03J53	86.9	Cyto			3	0.21				
ATP-binding subunit of Clp protease and DnaK/DnaJ chaperones (STER_1578)	Q03J94	77.0	Cyto	13	1.83	13	2.81	19	4.12	4	0.35
Elongation factor G (fusA)	Q03IS1	76.5	Cyto					8	0.95		
60 kDa chaperonin (groL)	Q03MK3	56.8	Cyto			6	0.74				
Transcriptional regulator (STER_1071)	Q03KK2	53.4	Cyto	6	2.16					3	0.67
SSU ribosomal protein S1P (STER_0639)	Q03LL8	43.8	Cyto					8	2.59		
Transcriptional regulator (STER_0378)	Q03M93	43.8	Cyto	5	4.01			4	1.51		
SSU ribosomal protein S1P (STER_0639)	Q03LL8	43.8	Cyto			4	0.90				
Elongation factor Tu (tuf)	Q03LX0	43.7	Cyto	11	5.95	13	17.33	12	9.00	11	3.83
Phosphoglycerate kinase(pgk)	Q03IS8	42.1	Cyto			3	0.41				
50S ribosomal protein L2 (rplB)	Q03IF4	29.9	Cyto	4	2.59			7	11.92		
30S ribosomal protein S3 (rpsC)	Q03IF7	24.0	Cyto					3	1.15		
Protein GrpE (grpE)	Q03MR7	23.3	Cyto					4	4.01		
30S ribosomal protein S4 (rpsD)	Q03I94	23.0	Cyto	3	0.64						
50S ribosomal protein L4 (rplD)	Q03IF2	22.1	Cyto	3	2.16			4	9.00		
50S ribosomal protein L5 (rplE)	Q03IG3	19.7	Cyto					5	2.51		
Heat shock protein Hsp20	Q03I62	16.3	Cyto					4	9.00		
50S ribosomal protein L17 (rplQ)	Q03IH8	14.4	Cyto					4	24.12		
50S ribosomal protein L7/L12 (rplL)	Q03LT1	12.3	Cyto	3	1.37	3	2.16	4	2.16		
Phosphotransferase system. HPr-related protein (STER_1243)	Q03K41	8.8	Cyto					3	99.00		
50S ribosomal protein L29 (rpmC)	Q03IF9	7.8	Cyto					3	30.62		
50S ribosomal protein L30 (rpmD)	Q03IG9	6.3	Cyto					3	315.23		
Uncharacterized conserved protein (STER_0283)	Q03MH9	66.0	-	3	0.78			3	0.33	4	0.62
Uncharacterized conserved protein (STER_0734)	Q03LD2	46.0	-	8	6.50			8	5.49	6	2.65
Uncharacterized protein (STER_0708)	Q03LF8	21.9	-	3	1.37						
Uncharacterized conserved phage related protein (STER_0813)	Q03L63	18.8	-	3	2.98					6	38.81

emPAI: exponentially modified Protein Abundance Index [31]

Nb id pept: number of identified peptides belonging to identified protein

Prot Id: Identification sequence from the following databases TRembl or Swiss prot (in italic)

Locations of proteins were predicted either by Uniprot data bank or by similarity to subcellular located proteins [35]. Three locations are proposed: cell surface (CS), membrane-located protein (M) and cytoplasm (Cyto).

B. Identified peptides of PrtS cell envelope proteinase (CEP) after shaving

Peptide		Sequence	Length	CEP Domains
Start	End			
158	176	LSVADETTAITNQEEAKPQ	19	Propeptide domain
158	188	LSVADETTAITNQEEAKPQNIDSNTIITVPK	31	Propeptide/Catalytic
177	188	NIDSNTIITVPK	12	Catalytic domain
196	224	GEGTVVAIIDSGLDVDHDLHISDLSTAK	29	Catalytic domain
216	224	HISDLSTAK	9	Catalytic domain
236	249	EVAGISYGEWFNDK	14	Catalytic domain
253	264	GYNYVDVNTVLK	12	Catalytic domain
312	321	ATTGAALYVK	10	Catalytic domain
329	360	LGADSNLSLGGANGSVVNMNENVTAIEAAR	32	Catalytic domain
350	360	ENVTAIEAAR	11	Catalytic domain
362	400	AGVSVVIAAGNDGTFGSGHSNPSADYPDYGLVGAPSTAR	39	Catalytic domain
381	400	SNPSADYPDYGLVGAPSTAR	20	Catalytic domain
401	416	DAISVASYNNTTVGSK	16	Catalytic domain
417	433	VINIIGLENNADLNYGK	17	Catalytic domain
420	433	IIGLENNADLNYGK	14	Catalytic domain
421	433	IGLENNADLNYGK	13	Catalytic domain
424	433	ENNADLNYGK	10	Catalytic domain
451	473	EYEVYAGIGQASDFDGLDLTGK	23	Catalytic domain
463	473	SDFDGLDLTGK	11	Catalytic domain
615	624	QYLQATYPTK	10	Catalytic domain
616	624	YLQATYPTK	9	Catalytic domain
624	634	KSPQEIEALVK	11	Catalytic domain
625	634	SPQEIEALVK	10	Catalytic domain
648	656	ETTAYTSR	9	Catalytic domain
708	730	TLNYSTQLTTDTVQNGLITLAPR	23	A domain
711	730	YSTQLTTDTVQNGLITLAPR	20	A domain
712	730	STQLTTDTVQNGLITLAPR	19	A domain
716	730	TTDTVQNGLITLAPR	15	A domain
722	730	NGLITLAPR	9	A domain
769	778	NGYYLEGFVR	10	A domain
779	795	FTDVADGGDIVSIPYIG	17	A domain
779	797	FTDVADGGDIVSIPYIGFR	19	A domain
798	818	GEFQNLAVLEEPIYNLIADGK	21	A domain
807	818	EEPIYNLIADGK	12	A domain
819	856	GGFYFEPVTAQPSVDISHHYTGLVTGSTELIYSTDKR	38	A domain
870	903	NEAGYFVLELDESGKPHLAISPNGDDNQDSLAFK	34	A domain
876	903	VLELDESGKPHLAISPNGDDNQDSLAFK	28	A domain
893	903	GDDNQDSLAFK	11	A domain
909	925	NYTDLVASVYAADDTER	17	A domain

926	939	TNPLWESQPQSGNK	14	A domain
951	973	SSIIYPTEWNGTDSEGNALADGK	23	A domain
953	973	IIYPTEWNGTDSEGNALADGK	21	A domain
958	973	EWNGTDSEGNALADGK	16	A domain
1001	1020	ESPVITTATYDETNFTFNPR	20	A domain
1033	1063	EQVFYLVADASGVTTIPSLLENGDVTVSDNK	31	A domain
1064	1085	VFVAQNDDGSFTLPLDLADISK	22	A domain
1086	1101	FYYTVEDYAGNISYEK	16	A domain
1087	1101	YYTVEDYAGNISYEK	15	A domain
1088	1101	YTVEDYAGNISYEK	14	A domain
1102	1112	VENLISIGNEK	11	A/H domains
1123	1142	DTNSPVPILFSYSVTDETGG	20	H domain
1132	1142	FSYSVTDETGG	11	H domain
1133	1142	SYSVTDETGG	10	H domain
1150	1158	YAGDTSVLK	9	H domain
1169	1183	FLYDTEWSSLAGETK	15	H domain
1170	1183	LYDTEWSSLAGETK	14	H domain
1228	1239	ADGQAIQLPNAK	12	H domain
1294	1307	ELIAELAGLEETAR	14	H domain
1322	1333	ALEDANAVYANK	12	H domain
1363	1386	LIAEVSNYTPTQANFIYYNAENTK	24	H domain

Cell surface proteins of *S. thermophilus* wild-type LMD-9 were shaved by trypsin.

Peptides corresponding to CEP of the wild-type strain LMD-9 are presented with their start and end on the protein including the signal sequence. Their sequence, length and the corresponding domain are indicated.

C. Identified peptides of PrtH⁺ cell envelope proteinase (CEP) after shaving

Peptide		Sequence	Length	CEP Domains
Start	End			
56	67	AAESTTANLTNK	12	Propeptide domain
205	224	YKGEGETVVSIIDTGIDPNHK	20	Catalytic domain
207	224	GEGTVVSIIDTGIDPNHK	18	Catalytic domain
339	367	LGADVLNMSLGSVSGETEDDPEVAAVER	29	Catalytic domain
371	394	KGTAAVISAGNSGTSNSEIEGVNK	24	Catalytic domain
395	412	AYYGNPDMETLGNPGTAR	18	Catalytic domain
397	412	YGNPDMETLGNPGTAR	16	Catalytic domain
413	424	SATTVASAENTK	12	Catalytic domain
425	438	ATTDGVTITSADGK	14	Catalytic domain
439	455	TTIAGPEATQLSEGTDNR	17	Catalytic domain
505	520	YAEAGAAAGLIIVNNK	16	Catalytic domain
521	545	AGDITGMLLNAGFPTAGLSATSGEK	25	Catalytic domain
549	559	YVEAHPDEALK	11	Catalytic domain
560	572	VSIVVQALNNSAR	13	Catalytic domain
639	648	NGAFYATYQK	10	Catalytic domain
660	682	TLEMNTASIQPDISHDNVIVSPR	23	Catalytic domain
684	700	QGAGFINANATIQUALAK	17	Catalytic/A domains
701	717	NPSTVVSSNGYPGVELK	17	A domain
748	765	NSDVYTSATDSSAVLYDK	18	A domain
748	766	NSDVYTSATDSSAVLYDKK	19	A domain
774	786	ASGDIVVPANSTK	13	A domain
787	799	ELTLTLTLPSDFK	13	A domain
800	819	ENQYVEGFLTFSNDSQLR	20	A domain
922	934	VINTLASLSNATK	13	A domain
935	964	TYYNSQAQSYTYFDDAPSWDGTDFDQQANK	30	A domain
965	976	TVNAPDGNYYTYR	12	A domain
977	995	ISATIDGTNTEQHYDIPVK	19	A domain
1137	1149	NGTYVFSGTYPSK	13	B domain
1158	1172	DGQTHDLNVESDGNK	15	B domain
1187	1198	TTVTLYADSDHK	12	B domain
1203	1214	KQDITVSLVPAK	12	B domain
1231	1245	DSSAALAQTSENTVK	15	B domain
1271	1307	LNADHTFSTELPVSFGENDFIVATDSNGNSSSVEQK	37	B domain
1316	1330	TTVSSSDVTFDNGIK	15	B domain
1380	1390	VVLNIGTHGAK	11	B domain
1391	1402	IFPALIGDSTVR	12	B domain

1433	1446	DKFTISGTISDDYK	14	B domain
1447	1469	FYDLSINGNDVETSWSAVDYHSK	23	B domain
1824	1833	STAQAYSSLK	10	W domain (S-Layer)
1876	1885	NSFVYQSNGK	10	W domain (S-Layer)

Cell surface proteins of *S. thermophilus* LMD-9 PrtH⁺ mutant were shaved by trypsin. Peptides corresponding to CEP of PrtH⁺ mutant are presented with their start and end on the protein including the signal sequence. Their sequence, length and the corresponding domain are indicated.

D. Identified peptides of PrtH⁺WANS cell envelope proteinase (CEP) after shaving

Peptide		Sequence	Length	CEP Domains
Start	End			
56	67	AAESTTANLTNK	12	Propeptide domain
100	124	SATPAATNGSVSANSSSAEIEQASK	25	Propeptide domain
148	159	SYGYVVNGFATK	12	Propeptide domain
182	204	VYYANDSSADNMANVSTVWNNYK	23	Propeptide/Catalytic
205	224	YKGEGETVVSIIIDTGIDPNHK	20	Catalytic domain
314	338	AFSNSDSSASTDSTSIIGAIDDSAK	25	Catalytic domain
339	367	LGADVLNMSLGSVSGEQTEDDPEVAAVER	29	Catalytic domain
347	367	SLGSVSGEQTEDDPEVAAVER	21	Catalytic domain
371	394	KGTAAVISAGNSGTSNSEIEGVNK	24	Catalytic domain
372	394	GTAAVISAGNSGTSNSEIEGVNK	23	Catalytic domain
395	412	AYYGNPDMETLGNPGTAR	18	Catalytic domain
397	412	YGNPDMETLGNPGTAR	16	Catalytic domain
413	424	SATTVASAENTK	12	Catalytic domain
425	438	ATTDGVTITSADGK	14	Catalytic domain
439	455	TTIAGPEATQLSEGTD	17	Catalytic domain
521	545	AGDITGMLLNAGFPTAGLSATSGEK	25	Catalytic domain
549	559	YVEAHPDEALK	11	Catalytic domain
560	572	VSIVVQALNNSAR	13	Catalytic domain
626	638	GTQALVSQTMNDK	13	Catalytic domain
639	648	NGAFYATYQK	10	Catalytic domain
660	675	TLEMNTASIQPDISHD	16	Catalytic domain
660	682	TLEMNTASIQPDISHDNVIVSPR	23	Catalytic domain
667	682	SIQPDISHDNVIVSPR	16	Catalytic domain
684	700	QGAGFINANATIQALAK	17	Catalytic/A domains
699	717	AKNPSTVVSSNGYPGVELK	19	A domain
701	717	NPSTVVSSNGYPGVELK	17	A domain
703	717	STVVSSNGYPGVELK	15	A domain
748	765	NSDVYTSATDSSAVLYDK	18	A domain
748	766	NSDVYTSATDSSAVLYDKK	19	A domain
754	765	SATDSSAVLYDK	12	A domain
754	766	SATDSSAVLYDKK	13	A domain
774	786	ASGDIVVPANSTK	13	A domain
787	799	ELTLTLTLPSDFK	13	A domain
800	810	ENQYVEGFLTF	11	A domain
800	819	ENQYVEGFLTFNSSDSSQLR	20	A domain
805	819	EGFLTFNSSDSSQLR	15	A domain
809	819	TFNSSDSSQLR	11	A domain
810	819	FNSSDSSQLR	10	A domain
922	934	VINTLASLSNATK	13	A domain

935	964	TYYNSQAQSYTYFDDAPSWDGTDFDQQANK	30	A domain
940	964	QAQSYTYFDDAPSWDGTDFDQQANK	25	A domain
943	964	SYTYFDDAPSWDGTDFDQQANK	22	A domain
965	976	TVNAPDGNITYR	12	A domain
966	976	VNAPDGNITYR	11	A domain
967	976	NAPDGNITYR	10	A domain
977	995	ISATIDGTNTEQHYDIPVK	19	A domain
977	1004	ISATIDGTNTEQHYDIPVKVDSVAPVVK	28	A domain
981	995	IDGTNTEQHYDIPVK	15	A domain
985	995	NTEQHYDIPVK	11	A domain
1032	1059	DELSGLSGDANVSVNGVSAQLEYDPTAK	28	A domain
1068	1078	VEIDLSPAQAK	11	A domain
1079	1118	ALQAGTNTFSVALFDNAANAGTASGEGNKPGETNFGLVLR	40	A/B domains
1088	1118	SVALFDNAANAGTASGEGNKPGETNFGLVLR	31	A/B domains
1137	1149	NGTYVFSGTYPK	13	B domain
1150	1172	LYGTYTDKDGQTHDLNVEDGNGK	23	B domain
1158	1172	DGQTHDLNVEDGNGK	15	B domain
1187	1198	TTVTLYADSDHK	12	B domain
1203	1214	KQDITVSLVPAK	12	B domain
1204	1214	QDITVSLVPAK	11	B domain
1215	1230	VESLSVDKNDTYDETK	16	B domain
1215	1245	VESLSVDKNDTYDETKDSSAALAQTSENTVK	31	B domain
1231	1245	DSSAALAQTSENTVK	15	B domain
1271	1307	LNADHTFSTELPVSFGENDFIVATDSNGNSSSVEQK	37	B domain
1314	1330	GKTTVSSSDVTDFNGIK	17	B domain
1316	1330	TTVSSSDVTDFNGIK	15	B domain
1356	1368	VKRPTTLQIGGK	13	B domain
1380	1390	VVLNIGHTGAK	11	B domain
1391	1402	IFPALIGDSTVR	12	B domain
1409	1432	LSFYVDAEAPTLNLDSENTVYTNK	24	B domain
1433	1446	DKFTISGTISDDYK	14	B domain
1435	1446	FTISGTISDDYK	12	B domain
1447	1467	FYDLSINGNDVETSWSAVDYH	21	B domain
1447	1469	FYDLSINGNDVETSWSAVDYHSK	23	B domain
1475	1483	NFKHEVDLK	9	B domain
1493	1513	VTDIQGNSSSQALVYYEPAK	21	B domain
1514	1526	TLAEPSVEQVVNK	13	B domain
1564	1573	VTENGTVQFK	10	B domain
1828	1851	KDEGTVTPPPIDSEIVDVQAPPVK	24	W domain (PrtS)
1829	1851	DEGTVTPPPIDSEIVDVQAPPVK	23	W domain (PrtS)
1852	1873	DTGNSEHVPQKPNPQPTLPR	22	W domain (PrtS)
1852	1879	DTGNSEHVPQKPNPQPTLPRPVTLQA	28	W domain (PrtS)
1874	1888	PVTLQASLSPPNQEK	15	W domain (PrtS)

Cell surface proteins of *S. thermophilus* LMD-9 PrtH⁺WANS mutant were shaved by trypsin. Peptides corresponding to CEP of the PrtH⁺WANS mutant are presented with their start and end on the protein including the signal sequence. Their sequence, length and the corresponding domain are indicated.

Additional file 2

Additional file 2

Sequencing primers

PrtH+

Primer	sequence	Hybridization temperature (°C)	Target sequence
PrtSupUpF	TACCAGCCAAATTCATCACG	55	Upstream <i>prtS</i>
HEmS01_R	GTCGTTTGTATTCCCCTCAAC	55	Upstream <i>prtS</i>
HEmS02_F	AGCTTCCACATGAAATTGACTG	55	<i>prtS</i>
HEmS02_R	AAACTGCACCCAAAAGAACAG	55	<i>prtS</i>
HEmS03_F	GAAGGAGAAAACTAGGAGGAAAAAG	55	<i>prtH</i>
HEmS03_R	AAACGGTTGAAACGTTAGCC	55	<i>prtH</i>
HEmS04_F	TAACGGATTGCAACCAAAG	55	<i>prtH</i>
HEmS04_R	TTAGTGGCACGTTCAACAGC	55	<i>prtH</i>
HEmS05_F	AATCGATGATTCTGCCAAGC	55	<i>prtH</i>
HEmS05_R	GTAGGGAAGCCAGCGTTAAG	55	<i>prtH</i>
HEmS06_F	TGTCAAGCGTGGTGAACCTAC	55	<i>prtH</i>
HEmS06_R	GCCATTGCTGCTGACTACAG	55	<i>prtH</i>
HEmS07_F	TCATCGTTTCACCACGTAGAC	55	<i>prtH</i>
HEmS07_R	TGTCAGGCTGAAATACATTTGG	55	<i>prtH</i>
HEmS08_F	TCTTCACAATTGCGTCTTCC	55	<i>prtH</i>
HEmS08_R	GCCATTGACAGAAACATTTGC	55	<i>prtH</i>
HEmS09_F	TCAAGCAAGGTTGAAGATGC	55	<i>prtH</i>
HEmS09_R	TGGTCAGAATCAGCGTAAAGG	55	<i>prtH</i>
HEmS10_F	AAAGATGGTCAAACCCATGAC	55	<i>prtH</i>
HEmS10_R	TTACCAGTAAGGGTTAACTCACCAG	55	<i>prtH</i>
HEmS11_F	CGGTATCAAGTGGGGTACTCG	55	<i>prtH</i>
HEmS11_R	TGTCTACACTAGGCTCAGCTAAAGTC	55	<i>prtH</i>
HEmS12_F	GCATGAAGTTGACTTGAAGAAAGG	55	<i>prtH</i>
HEmS12_R	TTTTTCAGCATGCACAGGAG	55	<i>prtH</i>
HEmS13_F	GAAAAGCCTGCTGAACCAAC	55	<i>prtH</i>
HEmS13_R	GACACTCTTTATGTATCTACCTTCACC	55	<i>prtH</i>
HEmS14_F	AAGAAAGGTACTACCATTACCGTCTAC	55	<i>prtH</i>
ERY1_R	TTGAGTGTGCAAGAGCAACC	60	<i>ery</i>
ERY1_F	AAAGGGCATTAAACGACGAA	56	<i>ery</i>
Empg9R	GGACCTCTTTAGCTCCTTGG	55	<i>ery</i>
HEmS16_F	GGGAGGAAATAATTCTATGAGTCG	55	<i>ery</i>
HEmS16_R	CATACTTCTCAACAGTCCCTTGG	55	<i>prtS</i>
HEmS17_F	AGGAATGAGACGCATGAAGC	65	Downstream <i>prtS</i>
PrtSDnDnR	ACGACGATAACCAAGAATGC	65	Downstream <i>prtS</i>

PrtH+WANS

Primer	sequence	Hybridization temperature (°C)	Target gene
HemS12_F	GCATGAAGTTGACTTGAAGAAAGG	55	<i>prtH</i>
UpH_R	AACAGGAGCTGCAACTTGGTTATC	55	<i>prtH</i>
HEmS12In_F	TGAACCTTCTAAGGACAAACCTG	55	<i>prtH</i>
Style 20-1*	ATTCAGAGCATGTACCGATAG	55	<i>prtS</i>
Style 20*	TTCTTGTGACGTCGTATGC	55	<i>prtS</i>
HKanS14_F	TCGCCGTATGTAAGGATTTC	55	<i>kan</i>
HKanS13_R	CCACAATTATGATAGAATTTACAAGC	55	<i>kan</i>
HKanS15_F	ACGGACAGCCGGTATAAAG	55	<i>kan</i>
HKanS14_R	CATACTCTTCCGAGCAAAGG	55	<i>kan</i>
HKanS16_F	GGCGGACAAGTGGTATGAC	55	<i>kan</i>
HKanS15_R	TCTAGGTACTAAAACAATTCATCCAG	55	<i>kan</i>

*Galia *et al.* , 2009

Additional file 3

Primers used for qPCR experiments

qPCR Primer	Sequence	Size (bp)	Hyb Temp (°C)	DNA target	Product Size (bp)
Sigmaq_F	GACCCAACACCTGAGCAAAT	20	58	<i>sigma70/32</i>	130
Sigmaq_R	CCAAATGGCTGTCATCCTCT	20			
PrtSq_F	AATGCTTTAGCAGATGGTAAGT	22	58	<i>prtS</i>	126
PrtSq_R	CATAGGTAGCTGTGGTGATAA	21			
PrtHq_F	TGTAGCAACCGACTCTAATGG	21	58	<i>prtH</i>	133
PrtHq_R	CGAGTACCCCACTTGATACC	20			

The name, sequence, size, hybridization temperature (Hyb Temp), DNA target and expected product size are indicated.
bp (base pairs)

V Conclusion

Ce chapitre présente notre première stratégie d'études des protéases pariétales de *L. helveticus* CIRM-BIA 103. Cette stratégie était basée sur l'expression hétérologue de PrtH et d'une protéase chimérique PrtH⁺WANS chez *S. thermophilus* LMD-9 et a permis la mise au point d'un nouvel outil de sécrétion hétérologue chez les bactéries lactiques. N'ayant pu observer d'activité protéolytique chez les souches exprimant les protéases de paroi PrtH et PrtH⁺WANS, ces résultats ont soulevé des questions quant à l'activité de PrtH chez *L. helveticus* mais aussi sur la nécessité d'une maturase (PrtM) spécifique à PrtH. Cette dernière hypothèse impliquerait que les gènes, appartenant à la famille des maturases, retrouvés dans le génome *S. thermophilus* LMD-9 ne seraient pas efficace dans la maturation de PrtH. De même, la maturation de PrtS pourrait aussi être remise en question car les deux formes (mature et immature) de la protéase sont détectées à la surface de la cellule.

Chapitre 2

Relation entre le potentiel protéolytique des souches de *L. helveticus* et *S. thermophilus* selon les protéases exprimées sur la paroi et étude *in silico* de la structure secondaire des protéases pariétales des bactéries lactiques.

I Introduction

Dans le premier chapitre, nous avons mis en avant différents systèmes envisageables pour exprimer de façon hétérologue une protéase de paroi de *L. helveticus* chez *S. thermophilus*. La souche *S. thermophilus* LMD-9 présente la capacité d'être aisément transformable grâce à sa compétence naturelle, ce qui permet d'intégrer de grands fragments d'ADN exogènes directement dans le chromosome de cette souche. Ainsi, les différentes options exploitables chez cette espèce en vue de sécréter une protéase ancrée à la paroi ont été présentées. De plus, une comparaison de la composition des parois de *L. helveticus* et *S. thermophilus* a été réalisée en s'axant sur les connaissances bibliographiques afin de créer une protéase chimère adaptée à l'environnement pariétal de *S. thermophilus*. Finalement deux types de protéases ont été exprimés à la surface de *S. thermophilus* : la protéase PrtH correspondant exactement à celle produite chez la souche *L. helveticus* CNRZ32 CIRM-BIA 103 (à l'exception de la séquence signal) puis une protéase PrtH⁺WANS, issue de PrtH mais dont le domaine d'ancrage (W) a été substitué par les domaines d'ancrage (W et AN) de la protéase PrtS de *S. thermophilus*. Cette stratégie a été décrite dans l'article Lecomte et al (2014). Bien que la protéase chimérique PrtH⁺WANS et la protéase PrtH aient été identifiées à la surface des mutants de *S. thermophilus* par shaving, aucune activité protéasique chez ces mutants, n'a pu être détectée soit par une augmentation du taux de croissance en culture lait soit par hydrolyse de substrats synthétiques.

L'expression hétérologue de PrtH de *L. helveticus* chez *S. thermophilus* a alors soulevé de nouvelles questions quant à l'activité de chaque protéase pariétale de *L. helveticus* CNRZ32 CIRM-BIA 103 et plus particulièrement sur les conditions nécessaires à leur activité. Pour répondre à ces questions, nous avons mis en place une stratégie alternative visant à définir l'activité protéolytique de différentes souches de *L. helveticus* ne possédant qu'un seul gène de protéase de paroi dans leur génome. Ainsi, des souches de *L. helveticus* possédant un seul gène de protéase de paroi ont été sélectionnées puis leur activité a été testée *in vitro* dans des conditions visant à se rapprocher de celles rencontrées en milieu fromager. Ensuite, les souches les plus protéolytiques ont été utilisées dans la fabrication de fromages de type Emmental pour comparer leurs activités protéolytiques *in situ* à celles obtenues lors des protéolyses *in vitro*. Enfin, une étude *in silico* a été menée afin d'établir les points de similarité et de divergence pouvant expliquer les différences dans l'organisation de la séquence de chacune des protéases en se concentrant plus particulièrement sur la structure

secondaire et les clusters hydrophobes des protéases de paroi de *L. helveticus* et *S. thermophilus*.

II Les protéases de *Lactobacillus helveticus* et leurs capacités à hydrolyser les caséines α_{s1} et β à différentes concentrations de NaCl: de l'*in vitro* aux fromages suisses. (Article)

Pour soumission à *Journal of dairy Science*

**Valérie Gagnaire, Xavier Lecomte, Romain Richoux, Magali Genay, Nicolas Pinon,
Julien Jardin, Valérie Briard-Bion, Lydie Aubert- Frogerais, Marine Nurdin, Jessica
Warlouzel, Jean–René Kerjean, Anne Thierry**

Résumé :

Lactobacillus helveticus et *Streptococcus thermophilus* possèdent un système protéolytique qui peut jouer un rôle important sur les propriétés fonctionnelles des fromages à pâte pressée cuite. Les protéases de paroi sont les premiers acteurs de ce système protéolytique dont la présence et/ou leur expression varient selon les espèces de bactériennes. Ainsi, certaines souches de *S. thermophilus* peuvent exprimer une protéase de paroi, PrtS, alors que les souches de *L. helveticus* peuvent exprimer jusqu'à quatre gènes de protéases de paroi, *prtH*, *prtH2*, *prtH3* et *prtH4*. Cependant, l'activité spécifique et le rôle de chacune de ces protéases sont toujours méconnus tout comme l'influence du microenvironnement, tels que le pH ou la teneur en sel, sur leur activité.

Le but de cette étude était d'évaluer comment différents pH (5,2 et 7,5) et différentes concentrations en NaCl (de 0% à 4,5% NaCl/volume) pouvaient moduler les activités protéolytiques de souches de *L. helveticus* et *S. thermophilus* produisant différentes protéases de paroi en suivant la dégradation des caséines α_{s1} and β dans des conditions *in vitro* et en fromage.

Dans cette étude, nous avons montré par « shaving » l'expression simultanée des quatre protéases de paroi par la souche *L. helveticus* CNRZ32 CIRM-BIA 103 pendant la phase exponentielle de croissance en lait. Les tests *in vitro* et fromage ont montré que les souches

produisant PrtH3 étaient plus protéolytiques et dégradait préférentiellement la caséine β . De plus, l'activité de PrtH3 semblait être prédominante pour protéolyser des caséines natives comparée aux activités des autres protéases de paroi (PrtH, PrtH2 et PrtH4) qui étaient produites par la souche *L. helveticus* CNRZ32, et qui pourraient être présentes à la surface afin de compléter la protéolyse des caséines. Le système protéolytique de *S. thermophilus*, arborant PrtS, présentait une activité protéolytique plus faible que les souches de *L. helveticus* arborant au moins PrtH3. L'analyse *in vitro* a montré qu'à pH 5,2, le pH habituel de l'Emmental, les activités des systèmes protéolytiques des deux espèces testées étaient augmentées. En fromage, après 48 jours d'affinage, la production de peptides dépendait essentiellement des souches de levain utilisées avec une production augmentée de 37 % dans les fromages produits avec une souche arborant les quatre protéases de paroi qu'avec une souche n'arborant que PrtH3. De plus, les variations de teneur en sel induisaient uniquement une diminution de la vitesse de dégradation des caséines en présence de fortes teneurs en sel, tant *in vitro* qu'en fromage. Enfin, nous avons aussi montré que la production d'Emmental à faible teneur en sel était techniquement réalisable sans affecter les paramètres du fromage.

Ce travail a permis d'élargir notre compréhension sur l'activité des systèmes protéolytiques de surfaces de *L. helveticus* et *S. thermophilus* selon les protéases de paroi exprimées. Ainsi les variations du microenvironnement modulaient bien la dégradation des caséines natives avec une plus forte sensibilité aux variations de pH qu'aux variations de teneur en sel.

Mots Clés : *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus thermophilus*, Protéases de paroi (CEP), Système protéolytique de surface, Protéolyse, Lait, Fromage Emmental, NaCl, pH, microenvironnement.

Proteinases of *Lactobacillus helveticus* and their distinct capability to hydrolyse α_{s1} - and β -caseins at different NaCl concentrations: from *in vitro* experiments to Swiss-type cheeses

For submission to *Journal of dairy Science*

Valérie Gagnaire^{1,2}, Xavier Lecomte^{1,2,3,4}, Romain Richoux⁵, Magali Genay^{3,4}, Nicolas Pinon^{1,2}, Julien Jardin^{1,2}, Valérie Briard-Bion^{1,2}, Lydie Aubert-Frogerais⁵, Marine Nurdin⁵, Jessica Warlouzel⁵, Jean–René Kerjean⁵, Anne Thierry¹

¹ INRA, UMR1253, Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, 65 rue de Saint Brieuc, F-35042 Rennes, France.

² Agrocampus Ouest, UMR1253, Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, 65 rue de Saint Brieuc, F-35042 Rennes, France.

³ Université de Lorraine, Unité de Recherche Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux, Equipe Protéolyse et Biofonctionnalité des Protéines et des Peptides, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France.

⁴ INRA, UR AFPA Unité Sous Contrat 340, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France

⁵ Actalia, BP 50915, 35009 Rennes Cedex, France.

Abstract:

Lactobacillus helveticus and *Streptococcus thermophilus* have a proteolytic system that can play a major role on final functional properties of hard type cheeses. Cell-envelope proteinases (CEPs) are the first actors of this proteolytic system whose presence and/or expression vary among those bacterial species. Thus, *S. thermophilus* strains can express one cell-envelope proteinase (CEP), PrtS, while *L. helveticus* strains can express up to four CEP genes, *i.e.* *prtH*, *prtH2*, *prtH3* and *prtH4*. However, the specific activity and the role of each CEP are still unknown as well as the direct influence of the micro-environment such as pH or the salt content on their activity.

The aim of this study was to evaluate how changes in pH (5.2 and 7.5) and various NaCl contents, *i.e.* from 0 to 4.5% NaCl/moisture, could modulate proteolytic activities of *L. helveticus* and *S. thermophilus* strains harbouring different CEPs regarding the α_{s1} - and β -casein hydrolysis under *in vitro* and cheese conditions.

In this study, we showed by shaving the simultaneous expression of the four CEP genes by *L. helveticus* strain CNRZ32 CIRM-BIA 103 during the exponential growth in milk. Both *in vitro* conditions and in cheese, the more proteolytic strains were those that have at least PrtH3 and they preferentially degraded the β -casein. Moreover, the activity of PrtH3 seemed to be predominant in proteolysis of native caseins compared to the activities of other CEPs (PrtH, PrtH2 and PrtH4) which were produced in *L. helveticus* CNRZ32 strain, and may be present at the cell surface as a support to further hydrolyse casein peptides. *S. thermophilus* proteolytic system, harbouring PrtS, presented a lower activity than *L. helveticus* strains harbouring at least PrtH3. *In vitro* analyses showed that at pH 5.2, the regular Emmental pH, casein hydrolysis rates were increased compared to pH 7.5 for both species tested. In cheese, after 48 days of ripening, peptide production was essentially dependent on the proteolytic system of strain tested including CEP and intracellular peptidases released by cell lysis during ripening with a 37% higher production in cheese manufactured with the strain which possessed the four CEPs than strain with only PrtH3. Moreover, the variation in the salt content induced only a decrease in the casein hydrolysis rate at upper level of salt either *in vitro* and in cheese. Finally, we showed that Emmental production at a lower NaCl content was technically possible without modifying cheeses parameters.

This work enlarged the understanding of the proteolytic system activities at the cell surface of *L. helveticus* and *S. thermophilus* regarding the expressed CEPs. Thus, the micro-

environment variations impacted the native casein breakdown with a sensitivity higher due to pH variations than the salt content.

Key words: *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus thermophilus*, Cell-envelope Proteinase (CEP), Surface proteolytic system, Proteolysis, Milk, Emmental Cheese, salt, pH, micro-environment

1 Introduction

L. helveticus and *S. thermophilus* are used as co-starter for their specific properties. Indeed, *S. thermophilus* acidify milk more rapidly than *L. helveticus* which has the ability to accelerate the flavour development (Bartels et al., 1987a; b; Ardö and Pettersson, 1988; Drake et al., 1996), to reduce bitterness by hydrolysing bitter peptides (β -casein (f193-209) and α_{s1} -casein (f1-9)) (Lemieux and Simard, 1992; Soeryapranata et al., 2007), and to generate bioactive peptides like inhibitors of the angiotensin conversion enzyme (ACE)(for review, see Korhonen, 2009). These peptides are generated from the hydrolysis of milk caseins by the efficient proteolytic system of *L. helveticus* among which first actors are the cell-envelope proteinases (CEPs). *L. helveticus* strains display up to four CEPs named PrtH, PrtH2, PrtH3 and PrtH4 (Pederson et al., 1999; Genay et al., 2009; Broadbent et al., 2011) in contrast to other LAB having only one CEP on their cell-wall like PrtP for *Lactococcus lactis* or PrtB for *Lactobacillus delbrueckii* (Sadat-Mekmene et al., 2011a). Moreover, *S. thermophilus* strains with high proteolytic ability produce a CEP named PrtS like the strain LMD-9 which *in vitro* proteolytic activity was already studied (Miclo et al., 2012).

The proteolytic activity of *L. helveticus* strains has already been tested on purified β - and α_{s1} -caseins comparing *L. helveticus* strains classified as possessing one or two CEP genes (*prtH* and *prtH2*). This demonstrated that strains with two CEP genes improve the α_{s1} -casein breakdown (Sadat-Mekmene et al., 2011b), which was also confirmed in Swiss-type cheeses (Sadat-Mekmene et al., 2013) by using two strains having one or four CEP genes. The genome of *L. helveticus* strain CNRZ32 has recently been sequenced and assembled (Broadbent et al., 2013) such as the strain CIRM-BIA 103 (INRA, Jouy-en-Josas, France). They both possess the four CEP genes in their genomes. Even if the strains are genetically well characterized, few is known about the CEP production nor the proteolytic activity of each CEP on caseins under *in vitro* conditions or in cheese. Moreover, this proteolytic activity can be influenced by micro-environment during processing, like pH decreasing or salting. In Swiss-type cheeses, salting occurs after the starter bacteria (*S. thermophilus* and *L. helveticus*) have finished growing and decreased the pH to 5.2 (Fröhlich-Wyder and Bachmann, 2004). Thus, low pH and various salt content can affect their survival during ripening and modulate the activity of their proteolytic system including cell envelope proteinases (CEPs) which play a major role in initiating the proteolysis.

The aim of this study was to evaluate how pH and NaCl modulate the capability of *L. helveticus* and *S. thermophilus* strains harbouring different CEPs, to degrade α_{s1} - and β -

caseins under *in vitro* and cheese environments. The strategy used was to select *L. helveticus* strains possessing only one CEP, based on Broadbent et al. (2011), and to compare their proteolytic activity to our model strain CNRZ32 CIRM-BIA 103 which possesses the four CEP genes and a strain that do not possess any CEP genes, CNRZ328 CIRM-BIA 110. In parallel, *S. thermophilus* LMD-9 strain was used as wild-type strain harbouring PrtS as well as its isogenic mutant that does not express the PrtS CEP (Lecomte et al., 2014).

After verifying the presence of proteinases on the cell surface by shaving method, *in vitro* hydrolysis of α_{s1} - and β -caseins under various physicochemical parameters (pH and salt concentration) were performed on cell pellets. The most proteolytic strains were, therefore, chosen and used to produce Swiss-type cheeses in order to compare their proteolytic activities during cheese ripening at various salt concentrations.

2 Materials and Methods

2.1 Bacteria and growth conditions

L. helveticus and *S. thermophilus* strains (Table 1) were cultivated at 42°C without shaking either in 10% reconstituted Low Low Heat (LLH) milk, (Sadat-Mekmene et al., 2011b) or in rich media such as MRS for lactobacilli (Difco) and M17 supplemented with 2% lactose (LM17) (Terzaghi and Sandine, 1975) for streptococci. LM17 and MRS could be supplemented with 1.5% of agar for plate count. For precultures of *S. thermophilus* mutant strain, five $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of erythromycin were added to the media.

Table 1: *L. helveticus* and *S. thermophilus* strains used in this study and CEP genes identified in their genome sequences

Strains	Cell envelope proteinases genes					Origin	Reference
	<i>prtH</i>	<i>prtH2</i>	<i>prtH3</i>	<i>prtH4</i>	<i>prtS</i>		
<i>Lactobacillus helveticus</i>							
CNRZ32 CIRM-BIA 103	+	+	+	+	-	Cheese	Sadat-Mekmene et al, 2011
ITGLH77 CIRM-BIA 99	-	-	+	-	-	Cheese	Deutsch et al, 2000
R0052 (Rosell Institute)	-	-	-	+	-	Cheese	Naser et al, 2006
UPR14 (University of Milano)	+	-	-	-	-	Cheese	Broadbent et al, 2011
CNRZ328 CIRM-BIA 110	-	-	-	-	-	Cheese	Hebert et al, 2002
<i>Streptococcus thermophilus</i>							
ITG ST88	-	-	-	-	+	Cheese	
LMD-9	-	-	-	-	+	Yogurt/Cheese	Makarova et al, 2006
LMD-9 PrtS ⁻	-	-	-	-	-		Lecomte et al, 2014

ITG: Institut Technique du Gruyère, France (renamed Actalia); CNRZ, Centre National de Recherche Zootechnique, INRA, Jouy-en-Josas, France; CIRM-BIA, Centre International de Ressources Microbiennes-Bactéries d'Intérêt Alimentaire, INRA, Rennes, France. + Presence; - Absence.

2.2 *L. helveticus* strains characterizations

2.2.1 Genetic characterization

CEP genes for each *L. helveticus* and *S. thermophilus* strains were evidenced using general molecular biology techniques, DNA extraction and PCR amplifications according to Green and Sambrook (2012), and/or supplier's recommendations. Briefly, genomic DNA was extracted from the five *L. helveticus* strains and PCR were performed with primers described by Broadbent et al, 2011 to specifically amplify fragments of CEP genes with Taq DNA polymerase (Fermentas, Saint Rémy-lès-Chevreuse, France) in a Mastercycler proS (Eppendorf). Four fragments of different length were amplified for each strain corresponding to genes *prtH* (1.332 kb), *prtH2* (4.042 kb), *prtH3* (0.357 kb), and *prtH4* (3.386 kb).

2.2.2 Acidification rate

Growth in reconstituted milk was followed by monitoring the acidification with CINAC software (Corrieu et al., 1988). The acidification rate (pH units (UpH) per hour) was calculated from the slope of the pH curve as a function of time. Colony forming unit (CFU) counts were performed after the inoculation and at the stationary phase.

2.2.3 Surface protein identification by shaving and tandem mass spectrometry

Surface tryptic digestion of live cells, i.e. shaving, was performed according to Lecomte et al. (2014). Briefly, *L. helveticus* strains CNRZ32 CIRM-BIA 103 (CNRZ32), UPR14, ITGLH77 CIRM-BIA 99 (ITGLH77) and R0052 were grown at 42°C in 10% reconstituted skim milk to $OD_{480\text{ nm}} = 2$, which is equivalent to the exponential growth phase. Cells were washed and concentrated to $OD_{650\text{ nm}} = 30$ in PBS (Phosphate-buffered saline) containing 5 mM DL-Dithiothreitol (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) solution, adjusted to pH 8.5. Five µg of sequenced grade trypsin (Promega, Charbonnières, France) were added to 500 µL of the concentrated cell solution. In parallel, negative controls were carried out by adding to the cells the trypsin buffer without the enzyme. Cells were incubated 1h at 37°C under shaking (180 rpm). Supernatants were harvested by centrifugation at 10,000 g, 10 min at room temperature and filtrated through a 0.45 µm filter (Millex PVDF, 13 mm, Millipore, Molsheim, France). Each supernatant was divided in two: in the first half, the reaction was stopped by adding 15 µL Trifluoroacetic acid (TFA) 10% (v/v) (Sigma Aldrich) and samples were stored at -20°C. In the second half, supernatants were incubated overnight at 37°C under

gentle shaking (100 rpm) in presence of 1 µg of trypsin then, the reaction was stopped by adding 15 µL TFA 10% (v/v). All samples were stored at −20°C before mass spectrometry analyses.

Mass spectrometry (MS) experiments were performed as described in Lecomte et al, (2014). To identify peptides, all data (MS and MS/MS) were submitted to X! Tandem using the X! Tandem pipeline developed by PAPPSO (Plateforme d'Analyse Protéomique de Paris Sud-Ouest (PAPPSO), INRA, Jouy-en-Josas, France, <http://pappso.inra.fr>).

The search was performed against a database composed of the taxonomy Bacilli from www.uniprot.org (Taxon identifier: 91061) to which was added the deduced sequences of the four CEP of *L. helveticus* CNRZ32 CIRM-BIA 103 (PrtH, PrtH2, PrtH3 and PrtH4), and PrtH3 from *L. helveticus* ITGLH77 CIRM-BIA 99. Database search parameters were specified as follows: trypsin cleavage was used and the peptide mass tolerance was set to 10 ppm for MS and 0.05 Da for MS/MS. Oxidation of methionine was selected as a variable modification. Semitryptic peptides were allowed during the “refinement” process of X!tandem. For each peptide identified, a minimum score corresponding to an e-value below 0.05 was considered as a prerequisite for peptide validation. The identified proteins were conserved when at least two specific peptides were identified.

2.3 α_{s1} - and β -caseins *in vitro* hydrolysis

2.3.1 Assessment of casein hydrolysis

After growth in LLH milk ($OD_{480\text{ nm}} = 2$, before milk coagulation), cells were washed first in tri-sodium citrate solution 0.25 M (Carlo Erba, Val de Reuil, France) and centrifuged at 8,000 g, 10 min at 4°C and washed twice in Tris Buffer Salt at 150 mM NaCl then twice in 50 mM Tris–HCl pH 7.5. Cells were suspended at $OD_{650\text{ nm}} = 20$ in 50 mM Tris buffer pH 7.5 + 20 mM $CaCl_2$, or potassium lactate 50 mM pH 5.2 + 20 mM $CaCl_2$. Cells were diluted to $OD_{650\text{ nm}} = 10$ with the same buffers containing different NaCl concentrations to have final NaCl concentrations of 0.5%, 0.75%, 1.5%, 3% and 4.5% NaCl/moisture corresponding to level 0.33, 0.5, 1, 2 and 3. The α_{s1} - and β -caseins were added to each cell suspension at 5 mg.mL⁻¹ final concentrations. Samples were collected after 15, 30, 60, 120, 180 min and 15 h of hydrolysis. The reaction was stopped with 3 µl of 100 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). Cell pellets were eliminated after centrifugation (6,000 g for 10 min at 4°C), and the supernatant was filtered through a 0.45 µm-pore-size PVDF filter and was stored at -20°C.

Different controls were performed: i) hydrolysis of α_{s1} - and β -caseins in absence of NaCl in the Tris or lactate buffers; ii) incubation of the cells in absence of α_{s1} - and β -caseins to check cells lysis at NaCl level of 0, 1 and 3 in the Tris or lactate buffers and at 3 times of incubation and iii) casein control in absence of cells at NaCl level of 0, 1 and 3.

2.3.2 Tris-tricine SDS-PAGE

Hydrolysis of purified α_{s1} - or β -caseins by strains of *L. helveticus* grown in LLH milk was monitored by Tris-tricine SDS-PAGE at different times (from 15 min to 15 h) as described in Sadat et al, 2011. Electrophoresis was performed as described by Schagger and von Jagow (1987) using a Protean II system (16 by 16 by 0.1 cm; Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) with SDS–Tris-Tricine buffer and an acrylamide concentration gradient from 12 to 18%. Samples were solubilized in a denaturing buffer at pH 6.8 (v/v) containing 1.25 M Tris, 138 mM SDS, 38 mM DTT, 2.17 M glycerol, and 0.28 mM bromophenol blue in distilled water according to the method of Laemmli (1970). Gels were run overnight at a constant voltage of 90 V. Proteins and oligopeptides were stained with Coomassie brilliant blue R-250 (Serva Electrophoresis, Heidelberg, Germany). After scanning of the gels (Image Scanner II; Amersham Biosciences), molecular weights and volumes of the visualized bands were determined using ImageQuant TL (GE Healthcare) 1-dimensional (1D) densitometry software. The rate of casein degradation (% casein hydrolysed/min) was calculated from the slope of the decreasing density of α_{s1} - and β -casein bands between the T0 corresponding to the casein control without hydrolysis, to the disappearance of caseins band for each strain, at both pH and at the six NaCl concentrations tested.

2.3.3 Peptide profile by RP-HPLC

Hydrolysis profiles of the purified α_{s1} - and β -caseins at NaCl 1.5% were compared by reversed-phase high performance liquid chromatography as described in Sadat-Mekemene et al. (Sadat-Mekmene et al., 2011b). Prior to injection, samples were half-diluted with 200 μ l of 8.75 M urea and 50 μ l of 10% trifluoroacetic acid (TFA) (vol/vol). One hundred microliters of prepared samples were separated by reverse phase-HPLC (2695 separation module with 2487 detector, Waters Alliance, Saint Quentin en Yvelines, France) with a Vydac C18 column (4.6 mm i.d. $\times$ 250 mm), fitted with a precolumn containing the same phase. Separation was

performed using solvent A [0.106% trifluoroacetic acid (TFA; vol/vol) in MilliQ purified water] and solvent B [0.1% TFA (vol/vol), 80% acetonitrile (vol/vol), in MilliQ purified water] under conditions of a linear gradient from 5 to 60% solvent B using a flow rate of 1 mL.min⁻¹ at 40°C and a double detection at 214 and 280 nm.

2.4 In situ hydrolysis

2.4.1 Milk preparation and cheesemaking

Raw milk was purchased in a local herd (EARL Le Marchand, Pacé), pasteurised at 74°C for 20 sec in an electric tubular device (ActiJoule, Actini, Evian) and then skimmed at 55°C. The pasteurized skim milk was then microfiltered on an α -laval pilot equipped with a Membralox ceramic Gradient of Porosity Membrane (Pall-Exekia, Tarbes, France) with 1,4 μ m pore size (running conditions: 52°C, FCV 20, TMP: 1,2 b), to remove residual bacteria and somatic cells. The cream was heat-treated in Actijoule at 120°C for 20 sec. The protein and fat content of the skim milk microfiltrate and the cream composition were determined by IR-analyser (Lactoscope, Deft, The Netherlands) and the fat/casein ratio of the cheesemilk was adjusted to 1.15. Each batch of cheesemilk was stored at 4°C for 12, 36 or 70 hours for cheese making. A single strain of thermophilic lactobacilli was used for each week of cheese making experiment in order to avoid cross-contamination and salt x2 cheeses were made with 12 hours old milk, salt x1 cheeses were made with 36 hours old milk and salt x0.5 cheeses were manufactured with 70 hours old milk.

Three cheeses were made in parallel in 3 stainless steel double jacketed, double-O 200L cheese vats equipped with an automate (Roussel Inox, Creissels, France). The milk (100kg per vat) was supplemented with calcium (20 ml/vat of a 47% CaCl₂ solution, Maxical, Chr Hansen, Arpajon, France), warmed at 32°C and inoculated with starters: i) 0,12% of a culture of *S. thermophilus* (PALITG ST88 from Laboratoires Standa, Caen, France) grown at 42°C for around 4h in Marstar 412 A medium (Danisco-Dupont, Dangé Saint-Romain), ii) 0,1% of a culture of *L. helveticus* ITGLH77 or CNRZ32, grown on Phagex Lb medium (Laboratoires Standa) at 42°C for 6 or 8 h depending on the strain (target being the production of 6g/L of lactic acid) and iii) 1 g/vat of freeze dried *Propionibacterium freudenreichii* PALITGP20 (Laboratoires Standa). After 30 min of milk ripening, the milk (pH 6,60 $\pm$ and 32°C $\pm$) was coagulated using 20 ml of recombinant bovine chymosin (Chymax plus 200 IMCU/ml, Chr Hansen). When the objective firmness of the gel was reached, the coagulum was cut with blades.

In order to keep constant the final dry matter and similar composition for all cheeses with various salt content after brining, the recipe was modulated to increase the moisture at day 1 for the upper salt level cheeses as follows. Both gel firmness and cutting diagram were adjusted depending on the targeted salt content, with a higher size of curd grain for the upper salt level cheeses. To avoid pH differences at Day 1 cheese, deionised water at 33°C (10L) was also added after cutting the cheeses with upper salt content to increase moisture before brining. The curd grains and whey of the cheeses with lower salt content were stirred before cooking for 10 min and all cheeses were heated to 53°C in 25 min and cooked at this temperature for 10 min for upper salt or 20 min for regular and lower salt level cheeses. The curd draining was performed by gravity into a stainless steel macro perforated mould for pre-pressing at 10 g/cm² for 30 min. Thereafter, the pre-pressed curd was cut into five parts of around two kg each, which were placed in micro-perforated plastic moulds (18 cm diameter) for pressing at 100 g/cm² for one hour in a thermostated chamber (35°C, 90% RH) and then the acidification step was performed for 3h at 45°C and the next for 16h at 35°C. The cheeses were demoulded and cooled in the brining room (13°C) for 4 hours. One cheese block was withdrawn for analysis at Day 1 while the four remaining cheese blocks were salted in saturated brine under stirring at 12°C for 75 min, 4.5 h or 20h according to the final salt content required. Cheeses were soaked by 1000 ppm natamycin solution (Mycopim, Laboratoires Standa) before being packed under vacuum in semi-permeable and thermo-retractable ripening bags (BK1L, Cryovac, Epernon, France). They were ripened 20 days at 12°C and then 18 days at 23°C. Two kg of cheese were withdrawn for analyses at Day 8, 20, 34 and 48 of ripening, and sampled at the middle of the radius with a borer/punch.

Control-cheeses with *S. thermophilus* as a sole lactic starter were manufactured according to the process described above except the addition of 50 g of edible lactose powder (Lactalis Ingredients, Bourgbarré, France) per kilogram of skim milk before microfiltration, in order to reach a similar pH in cheese at Day 1.

2.4.2 Cheese analysis

Total solid was determined by drying method according to IDF standard n°4A. Fat content was determined using the acido-butyrometric method of Heiss (Heiss, 1961). Fat in Dry Matter (FDM) and moisture in non-fat substance (MNFS) were calculated as follows:

$$\text{FDM} = 100 \times (\text{Fat} / \text{Total solid})$$

$$\text{MNFS} = 100 \times (100 - \text{Total Solid}) / (100 - \text{Fat})$$

Calcium was measured by the complexometric method of Pearce (1977). NaCl was calculated from the determination of chloride by potentiometric method with a Chloride Model 926, (Sherwood Scientific Ltd, Cambridge, United Kingdom). Enumeration of the *L. helveticus* flora was performed according to the methods described by Thierry et al. (Thierry et al., 1998). Under sterile atmosphere, 10 g of grated Emmental cheeses, at 1, 8, 20, 34 and 48 day of ripening was dispersed in 90 ml of sodium citrate (20 g.L⁻¹) in bag and crushed in the Smasher (AES laboratoire, Bruz, France) for 4 min. From this solution, the bacterial cell counts were made. Cheese proteolysis was assessed by determination of total nitrogen (TN), pH 4.6 soluble nitrogen (SN) and 12% TCA-soluble nitrogen (NPN) according to Gripon et al. (1975) using the Kjeldahl method (IDF, 2001).

2.4.3 Measurement of cheese functionalities

Cheese stretchability (3 replicates per sample) was assayed by a method involving vertical traction of the cheese melted at 82°C according to Richoux et al. (2001). The length (mm) of strands of heated cheese was measured at the breaking point of the stretched strand.

Oiling off was measured by a butyrometric method (Richoux et al., 2001). Briefly, 3 g of ground cheese were melted at 65°C in a Van Gulik butyrometer placed in a water-bath for 20 min and the free oil was extracted by the addition of warm water (65°C) and centrifugation (350 g for 2 min). Results were expressed as g free oil per 100 g cheese or as g free oil per 100 g of fat, by dividing free oil by cheese fat content.

Flowability was measured by a modified Schreiber test. Eight grams of ground cheese were moulded and pressed to reconstitute a disc (4 cm diameter). This disc was put on a laser paper sheet and placed for 3 minutes in a domestic oven at 225°C for 3 min. After cooling at room temperature, six radius of the melted cheese were measured and the area of the melted cheese was evaluated. The melting index was calculated by dividing the area of the melted cheese with the area of the unmelted disc of cheese (Richoux et al., 2001).

Chewiness of the melted and partially defatted cheese obtained after the free oil determination (around 45°C) was measured by the extrusion strength (KgF) using the device developed by ACTALIA and INSA Rennes (Riberolles, 1990).

2.4.4 Preparation of the cheese water-soluble extracts (WSE)

Cheese aqueous phases were prepared by adding 40 g of distilled water to 10 g of grated Emmental (ratio 1:5) according to the method of Kuchroo and Fox (Kuchroo and Fox, 1982). The mix was blended using an ultra turrax (IKA®T18 basic, Staufen, Germany) for 5 min at 20,500 rpm and further stirred for 30 min at 40°C. Emmental samples were centrifuged at 6,000 g for 30 min at 4°C (Centrifuge Heraeus/Kendro Biofuge Primo R, Courtabœuf, France), to separate the aqueous phase from the pelleted caseins. Fat was eliminated and aqueous phase was filtered on Whatman filter paper 40 at 4°C and frozen at -20°C until further use.

2.4.5 Determination of the casein hydrolysis

Casein hydrolysis was evaluated by urea-PAGE of the insoluble pH 4.6 nitrogen fraction according to Collin et al. (1987). These fractions were expressed as the percentage of the total nitrogen (determined using the Kjeldahl method).

The peptide pattern of the cheese WSE was analyzed by SDS-PAGE as described by Schagger and von Jagow (1987) using Protean II system (16x16x0.1cm, BioRad, Marnes-la-Coquette, France) with SDS/Tris/Tricine buffer and a concentration gradient of acrylamide from 12 to 18% according to Sadat-Mekmene et al. (2011b).

2.4.6 Statistical Analyses

Analyses of variance (ANOVA) were performed with the significance level set at $P \leq 0.05$, using either one factor with FactoMineR, an R package (R Core Team, 2014) or using 2 factors ANOVA (pH and NaCl levels for the *in vitro* data; type of lactobacilli strains and NaCl levels for the Swiss-type cheese data). Newman Keuls test was performed as post ANOVA analysis.

Principal Component Analysis (PCA) was performed by using FactoMineR, an R package (R Core Team, 2014) on the following data: at D48 on stretching, oiling off, flowability, extrusion, β -, γ -, α_{s1} -, and α_{s1} -I-casein amount determined by urea PAGE, SN, NPN, measured NaCl/chloride concentration, total fatty acids, pH and bacterial count. For the other times of ripening proteolysis, indices and bacterial counts were used.

3 Results

3.1 Choice of *L. helveticus* and *S. thermophilus* strains

3.1.1 Choice and characterisation of *L. helveticus* strains

Five strains of *L. helveticus* were selected according to the results of Broadbent et al. (2011): CNRZ32 CIRM-BIA 103 (four CEP genes), CNRZ328 CIRM-BIA 110 (no CEP genes), UPR14 (*prtH*), ITGLH77 CIRM-BIA 99 (*prtH3*) and R0052 (*prtH4*) (Genay et al., 2009; Sadat-Mekmene et al., 2011b; Broadbent et al., 2011).

The presence or absence of the four CEP genes was checked by PCR amplification of each CEP gene using specific primer pairs for each gene (Broadbent et al., 2011) (Figure 1). All strains possessed their predicted CEP gene. Indeed, extracted genomes from strains UPR14, ITGLH77 CIRM-BIA 99, and R0052 allow specifically amplifying fragment of CEP genes, respectively *prtH*, *prtH3* and *prtH4*. Moreover, the strain CNRZ32 CIRM-BIA 103 which was used as a positive control for the detection of the four CEP genes by PCR amplification actually presents the four CEP genes in its genome with amplicon size corresponding to those described by Broadbent et al. (2011).

Genomes of strains CNRZ32 CIRM-BIA 103 and R0052 are available and present respectively four CEP genes (*prtH*, *prtH2*; *prtH3* and *prtH4*) and one CEP gene (*prtH4*) (Broadbent et al., 2013; Tompkins et al., 2012). No strains possessing the *prtH2* gene was successfully obtained. The strain CNRZ328 CIRM-BIA 110, which does not possess any CEP genes, was already characterized by Sadat-Mekmene et al. (2011b).

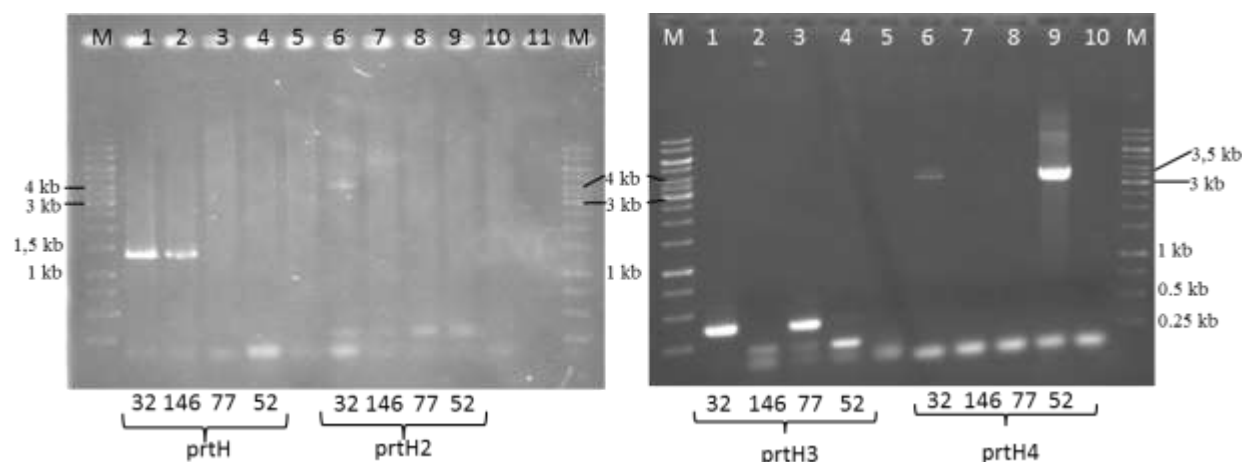


Figure 1: Detection of the CEP genes *prtH*, *prtH2*, *prtH3* and *prtH4* by PCR amplification from genomic DNA extracted from *L. helveticus* strains CNRZ32 CIRM-BIA 103 (32), ITGLH77 CIRM-BIA 99 (77), R0052 (52) and strain UPR14 (14). Primers used to perform PCR amplifications are identical to those used by Broadbent et al. (2011). They were designed to specifically amplify fragments of each of the four CEP genes encountered in *L. helveticus* CNRZ32.

Table 2: Acidification rates and forming colony count of *L. helveticus* strains possessing different CEP genes

<i>Lactobacillus helveticus</i> strains	CEP genes	Acidification rates (UpH.h ⁻¹)		Population (LOG ₁₀ CFU.mL ⁻¹)	
		Mean	SEM	Inoculation	Stationary phase
CNRZ32 CIRM-BIA 103	4 CEP genes	0.37	±0.01	6.94	8.98
ITGLH77 CIRM-BIA 99	<i>prtH3</i>	0.27	±0.00	6.97	8.91
R0052	<i>prtH4</i>	0.09	±0.00	6.65	<6.3
UPR14	<i>prtH</i>	±0.00	±0.00	7.38	3.73
Milk control		±0.00	±0.00	0	0

UpH: pH units; CFU: colony forming unit; SEM: Standard Error of the Mean

The acidification rates of the *L. helveticus* strains, reported in Table 2, varied from 0 to 0.37 ± 0.01 UpH.h⁻¹ for strains UPR14 to CNRZ32 CIRM-BIA 103. A maximum acidification rate was observed (0.27 ± 0.00 and 0.37 ± 0.01 UpH.h⁻¹) for *L. helveticus* strains ITGLH77 CIRM-BIA 99 and CNRZ32 CIRM-BIA 103 that was respectively 3 and 4 times higher than the *L. helveticus* strain R0052 (*prtH4*) (0.09 ± 0.00 UpH.h⁻¹). The *L. helveticus* strain UPR14 (*prtH*) does not grow in milk, no acidification was detected and a 4 Log decrease in the population enumeration was observed during the culture time (Table 2). Thus, this strain was not used in the study anymore. Moreover, the *L. helveticus* strain R0052 had low acidification rate in exponential phase of growth (0.09 ± 0.00 UpH.h⁻¹) and the number of colony forming unit (CFU) taken at the end of culture (45h) is close to inoculation one (around 6 Log₁₀ CFU.mL⁻¹, Table 2), likely due to cell lysis during stationary phase. Indeed, to verify this strain was able to grow in milk, another experiment was performed inoculating milk at 4.9 Log₁₀ CFU.mL⁻¹. After 40h of growth, population number reached 6.7 with a low acidification rate of 0.04.

3.1.2 The choice of *S. thermophilus* strains

Three stains of *S. thermophilus* were chosen for the *in vitro* and Emmental studies. First, we used the wild-type strain LMD-9 (Makarova et al., 2006), which is naturally competent and easily transformable, to test the *in vitro* proteolytic activity of PrtS, the unique CEP of *S. thermophilus*. Its isogenic mutant named PrtS⁻, which didn't express the protease PrtS (Lecomte et al., 2014), was used as a negative control. The maximum acidification rates of these two strains in milk were 0.87 ± 0.00 UpH.h⁻¹ for the wild-type strain LMD-9 and 0.35 ± 0.01 UpH.h⁻¹ for the PrtS⁻ mutant. Secondly, for Emmental production, the *S. thermophilus* ITGST88 strain has been chosen because this strain was successfully used for mini-Emmental production (Falentin et al., 2012) and possesses a *prtS* gene presenting 100% of identity with the *prtS* of the LMD-9 strain. Moreover, *S. thermophilus* ITGST88 strain had been classified among strains with a high acidification rate like LMD-9 strain (Galia et al., 2009).

3.2 CEPs detection by shaving on the cell surface

As the detection of CEP genes does not prove the CEP production, a shaving method, which consists in hydrolysing the cell surface proteins by trypsin and identifying the generated peptides by tandem mass spectrometry, was used (Solis et al., 2010; Olaya-Abril et al., 2012, 2014). The number of specific identified peptides of CEPs and their corresponding exponentially modified protein abundance index (emPAI) values for strains CNRZ32, ITGLH77 and R0052 are presented Table 3. The emPAI value was calculated as described by Lecomte et al, (2014) and represents the content of one protein among all the detected proteins in a same sample. This estimation of protein content in independent sample allows us to use shaving as a relative quantitation method (Rappsilber et al., 2002; Ishihama et al., 2005).

Table 3 : Identified peptides of CEPs after cell surface shaving of *L. helveticus* strains CNRZ32 CIRM-BIA 103 (CNRZ32), ITGLH77 CIRM-BIA 99 (ITGLH77) and R0052.

CEPs	Identified peptides			CEP (emPAI) in sample		
	Start	End	Sequences	CNRZ32	ITGLH77	R0052*
PrtH				(0.19)		
	335	357	NMSLGSVSGEQTEDDPEVAAVER	x		
	340	357	SVSGEQTEDDPEVAAVER	x		
	429	445	TTIAGPEATQLSEGTDNR	x		
	938	954	DDAPSWDGTTFDQQANK	x		
PrtH 2				(0.20)		
	65	81	DAQAPSDDKQDPVQK	x		
	674	692	ENVFDQNANDPKPDQGNR	x		
	693	701	LVNEDNYPR	x		
	783	810	SYHSDGDGATVDLDNGATNSDVFDWDGK	x		
	906	914	NSGFDDANK	x		
PrtH 3				(2.53)	(1.90)	
	122	137	DANGVELPANNQDHVK	x	x	
	157	167	VIDSGIDVDHK	x	x	
	158	167	IDSGIDVDHK	x		
	285	301	SLGGGVSAADLNNADQR	x	x	
	286	301	LGGGVSAADLNNADQR	x		
	332	344	ITDLDDYEPGGER	x	x	
	469	477	GFDTPVSPR		x	
	529	543	AYDFDDMGGGFTEVR	x	x	
	534	543	DMGGGFTEVR		x	
	565	574	SVELAPNETK	x	x	
	615	647	GDMTSENVFDQNANDAAPDIQGNHLINEDNYPR	x		
	627	647	ANDAAPDIQGNHLINEDNYPR		x	
	636	647	GNHLINEDNYPR		x	
	719	728	VLSDNHGPEK		x	
	742	755	STVNNSDTLEWDGK	x		
	792	808	DTPVIIDTTAPVLNNVK	x		
	867	882	VLTPEEQAALTSANK	x		
	915	932	AINGLPFNENSDDYNVGR	x	x	
	916	932	INGLPFNENSDDYNVGR	x		
	921	932	FNENSDDYNVGR	x		
	922	932	NENSDDYNVGR	x	x	
	995	1004	AWQHVDGEER		x	
	1079	1091	GWVEIDGPTFNAK		x	
	1080	1091	WVEIDGPTFNAK	x		
	1198	1219	FLADSPYEVDPENQADIHDNGK	x		
	1200	1219	ADSPYEVDPENQADIHDNGK		x	
	1335	1350	FDQEEQLDDQNGQPTT	x		
	1387	1400	KDDQADVKAEGQK	x	x	
	1388	1400	DDQADVKAEGQK	x	x	
	1414	1435	EDPESGQTTENAQSTESQEQNK	x	x	
	1452	1467	ENHGAGESTIESNQEK		x	

CEPs	Identified peptides			CEP (emPAI) in sample		
	Start	End	Sequences	CNRZ32	ITGLH77	R0052*
PrtH4				(0.33)		(0.08)
	162	173	GNVQSAWDQGYR			X
	491	506	AKPQTQLGYTTPVSPR			X
	559	572	YTFDDYGGGYTEQR	x		
	776	786	DNPDALEWDGK	x		
	1110	1122	GWTEVDGPSFNDK	x		
	1187	1205	TDPNPDIHFDDYMNDNDTTR	x		

CEPs: Cell-envelope Proteinases; Exponential modified Protein Abundance Index (emPAI) of CEPs in their samples corresponds to numbers in brackets.

* Only two peptides of PrtH4 were identified in supernatant sample after one hour of shaving by trypsin on R0052 cells surface but none after the second step of 20 hours of trypsinolysis (cf M&M).

The four CEPs (PrtH, PrtH2, PrtH3, and PrtH4) were actually produced by the *L. helveticus* strain CNRZ32 and only PrtH3 and PrtH4 were respectively produced by *L. helveticus* strains ITGLH77 and R0052 in milk medium (Table 3). It should be noted that for PrtH3, the number of identified peptides was 4 to 5 fold higher than for the other CEPs in *L. helveticus* strain CNRZ32.

Among CEPs identified peptides by shaving method (Table 3), peptides belonging to the signal sequence domain or to the pro-peptide domain were prospected. No peptides corresponding to any signal sequence of the four CEPs neither to the pro-peptide domain of PrtH and PrtH4 CEPs were detected while peptides belonging to pro-peptide domains of PrtH2 and PrtH3 were identified. Thus, for PrtH2, a peptide DAQAPSDDKQPDPVVQK belonging to the N-terminal sequence of its pro-peptide domain was identified and for PrtH3, the peptide DANGVELPANNQDHVK was identified in both samples of *L. helveticus* strains CNRZ32 CIRM-BIA 103 and ITGLH77 CIRM-BIA 99.

These shaving results demonstrated for the first time that the four CEPs of the *L. helveticus* strain CNRZ32 were expressed during the exponential growth in milk. Moreover, strains ITGLH77 and R0052 actually expressed one CEP, respectively PrtH3 and PrtH4. Finally, even if *prtH* gene has been detected in the genome of strain UPR14, no CEP peptides were identified in the corresponding samples, suggesting the absence of any CEP at the cell surface of this strain.

3.3 In vitro purified α_{s1} - and β -casein hydrolysis

3.3.1 Casein hydrolysis

The proteolytic activity of the four selected strains of *L. helveticus* (CNRZ32 CIRM-BIA 103 (Prth, Prth2, Prth3, and Prth4), ITGLH77 CIRM-BIA 99 (Prth3), R0052 (Prth4) and CNRZ328 CIRM-BIA 110 (no CEP) and the two strains of *S. thermophilus* (LMD9 (Prts⁺) and the Prts⁻ mutant) was tested *in vitro* on α_{s1} - and β -caseins at two pH conditions (5.2 and 7.5) and at different salt concentrations ranging from 0% to 4.5% NaCl/moisture. The pH 5.2 corresponds to pH of cheese after brining step and pH 7.5 corresponds to the pH usually used to study *in vitro* CEP activities. As shown in Figure 2, α_{s1} - (A) and β - (B) caseins were hydrolysed by the proteolytic system of *L. helveticus* strain CNRZ32 CIRM-BIA 103 at NaCl 1.5%, here presented as an example. In both pH conditions, a decrease of α_{s1} - and β -caseins was observed. A higher enzymatic activity was observed at pH 5.2 than pH 7.5. The lower activity was observed for α_{s1} -casein (Figure 2 A) at pH 7.5. Hydrolysis of α_{s1} - and β -caseins generated a set of peptides which migrated below 30 kDa and their area/density differently increased during hydrolysis. The electrophoretic peptide profile of α_{s1} -caseins did not differ between both pH, while there was a difference in the peptide profile of β -casein. Indeed, at pH 5.2, the area of two bands named P1 and P2 (Figure 2 B) increased during the first hour of hydrolysis and decreased to the end while at pH 7.5, two similar bands (P1' and P2') appeared at a lower area after three hours of hydrolysis. Finally, the lysis of bacterial cells was visible by a release of intracellular proteins above 30 kDa after 2 hours in most of the conditions tested. However, at upper salt concentration (4.5% NaCl/moisture), cells hydrolysis appeared earlier, i.e. after 30 minutes of hydrolysis (data not shown).

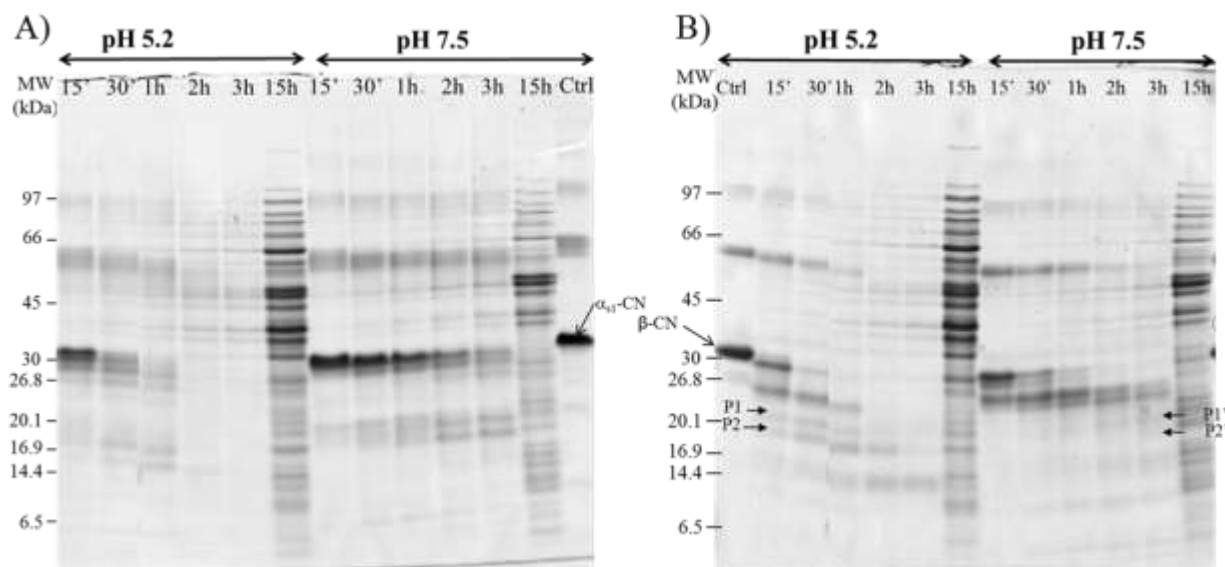


Figure 2: A) α_{s1} -casein and B) β -casein *in vitro* hydrolysis by *L. helveticus* CNRZ32 CIRM-BIA 103 at NaCl x1 (1.5% NaCl/moisture) observed in Tris-tricine SDS-PAGE with 12-18% acrylamide gradient. Hydrolysis were performed at pH 5.2 and 7.5 and samples were collected at six different times: 15 minutes (15'), 30 minutes (30'), 1, 2, 3, and 15 hours (respectively 1h, 2h, 3h and 15h). The controls (ctrl) α_{s1} -casein (A) and β -casein (B) correspond respectively to α_{s1} -casein in Tris-buffer (pH 7.5) and β -casein in lactate buffer (pH 5.2), used as negative controls (non inoculated) during the hydrolysis test. Molecular weight (MW) range of apparent molecular mass separation from 97 (top of gel) to 6.5 kDa (bottom) was reported on the left side of the gel.

The average of casein degradation rate was reported on Figure 3 to evaluate proteolytic efficiency of the strains and influence of pH on the proteolysis. The casein hydrolysis by *L. helveticus* and *S. thermophilus* strains showed a high difference according to the strains. The most proteolytic strains were *L. helveticus* strains ITGLH77 (PrTH3) and CNRZ32 (four CEPs), with a degradation rate of up to $6\% \cdot \text{min}^{-1}$. *L. helveticus* strain CNRZ32 seemed to preferentially hydrolyse the β -casein whereas *L. helveticus* strain ITGLH77 hydrolysed both α_{s1} - and β -caseins with a higher degradation of β -casein. The *L. helveticus* strain R0052 (PrTH4) only weakly hydrolysed β -casein and have quite no activity on α_{s1} -casein. The negative proteinase controls for both species, *L. helveticus* CNRZ328 CIRM-BIA 110 and *S. thermophilus* PrtS⁻ mutant, did not degrade caseins as expected. Finally, *S. thermophilus* LMD-9 strain weakly degraded the β -casein, compared to the *L. helveticus* strains ITGLH77 and CNRZ32. For all proteolytic strains, pH 5.2 allows having a higher rate of casein degradation except for *L. helveticus* strain ITGLH77 for which β -casein degradation was similar at both pH.

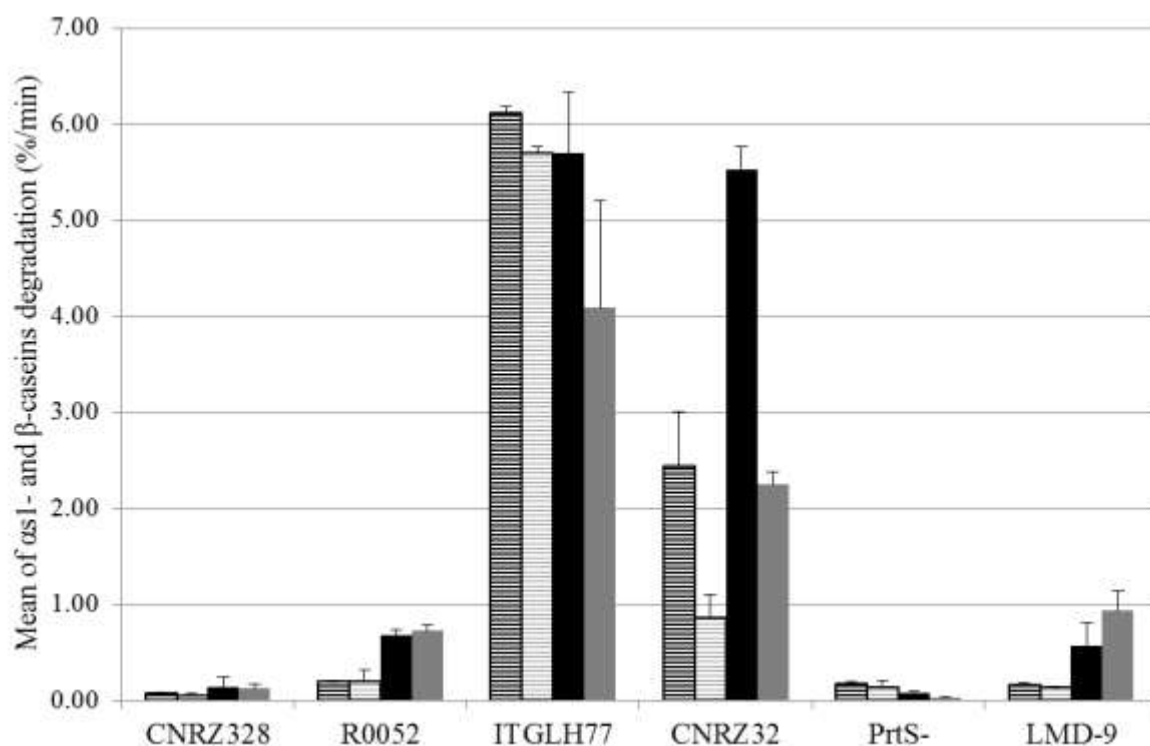


Figure 3: Rate of α_{s1} - and β -caseins degradation depending on streptococci and lactobacilli strains and pH. Strains studied were *L. helveticus* CNRZ32 CIRM-BIA 103 (CNRZ32), ITGLH77 CIRM-BIA 99 (ITGLH77), R0052 and CNRZ328 CIRM-BIA 110 (CNRZ328) and *S. thermophilus* strains were LMD-9 and PrtS⁻. The rate of α_{s1} -casein (dashed bar) and β -casein (solid bar) degradation were presented at both pH conditions pH 5.2 (black) and pH 7.5 (grey). The mean of caseins degradation rate were calculated with four salt concentrations (0; 0.33; 0.5 and 1).

To distinguish the impact of the three parameters tested, i.e. strains, pH and salt concentrations, the degradation rate of β -casein was reported as a function of α_{s1} -casein degradation rate (Figure 4) according to the different parameters. Thus, the casein degradation was as a main point strain-dependant and strains preferentially degraded β -casein. Firstly, the *L. helveticus* strain ITGLH77 (circles, Figure 4) was the most proteolytic strain with a higher proteolysis observed for both caseins. Secondly, the pH condition modulated the casein degradation rate with higher rate at pH 5.2 (solid symbols, Figure 4) than at pH 7.5 (empty symbols, Figure 4), as it is the case for example for *L. helveticus* CNRZ32, (squares, Figure 4), independently of the salt concentration. Regarding changes in salt concentrations, two distinguished effects could be separated: below and above NaCl level 1 (1.5% NaCl/moisture). Indeed, below NaCl level 1, the salt concentration weakly impacted the strains proteolytic activity. Above, i.e. at NaCl level 2 and 3 and at pH 7.5, the proteolytic activity decreased in a variable manner according to the strains. This was specially shown for the degradation rate of *L. helveticus* strain ITGLH77, with an up to twice decrease of the degradation rate of β -casein and 1.3 times lower degradation rate of α_{s1} -casein at pH 5.2 and

twice at pH 7.5. This high salt concentration also weakly modulated *L. helveticus* strain CNRZ32 proteolytic activity, decreasing almost twice the α_{s1} -casein degradation rate at both pH. As degradation rates of *L. helveticus* strains R0052 and CNRZ328 CIRM-BIA 110 and *S. thermophilus* strain PrtS⁻ were much lower than previous strains (below 1%.min⁻¹), those results were not presented Figure 4.

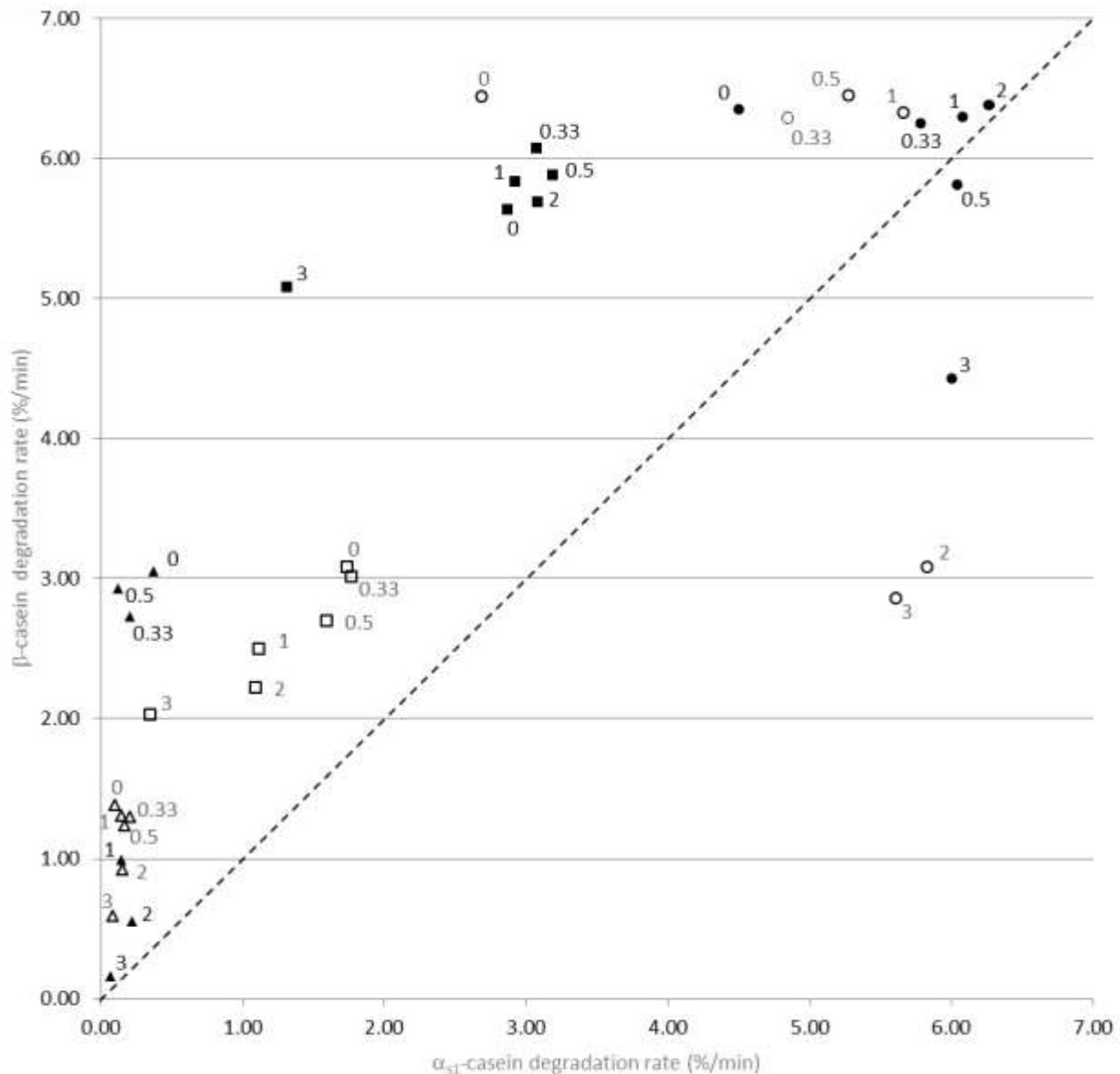


Figure 4: Relationships of the most proteolytic *L. helveticus* and *S. thermophilus* strains with regard to the degradation rate of α_{s1} -casein versus β -casein. Symbols: *L. helveticus* strains CNRZ32 CIRM-BIA 103 (squares), ITGLH77 CIRM-BIA 99 (circles), and *S. thermophilus* strain LMD-9 (triangles) were distinguished between pH 7.5 (empty) and pH 5.2 (solid). The corresponding salt concentrations were noted (0, 0.33, 0.5, 1, 2, and 3). The NaCl concentrations corresponded to a factor of the initial salt concentration in Emmental (1.5% NaCl/moisture). The dash line presents the equal degradation rate of α_{s1} - and β -caseins ($y = x$).

3.3.2 Peptide profiles of the most proteolytic strains

Proteolytic profiles of α_{s1} - and β -caseins generated by the most proteolytic strains *L. helveticus* strains CNRZ32 (four proteinases) and ITGLH77 (Prth3), and *S. thermophilus* strain LMD-9 (Prts), at the same salt concentration (NaCl 1) and at both pH 5.2 and pH 7.5, were compared by RP-HPLC (Figure 5). *L. helveticus* strain ITGLH77 generated much more peaks as α_{s1} - and β -caseins were highly degraded compared to *L. helveticus* strain CNRZ32 and *S. thermophilus* strain LMD-9. Moreover, the proteolytic profile of both α_{s1} - and β -caseins generated by *L. helveticus* strain ITGLH77 (black lines) at pH 5.2 presented new peaks or higher intensity peaks (Figure 5, arrows) compared to profiles at pH 7.5 (dashed lines). The proteolytic profile of caseins generated *L. helveticus* strain CNRZ32 presented few variations between both pH conditions (Figure 5, arrows). Finally, *S. thermophilus* strain LMD-9 only the β -casein and variations could be observed between the two pH conditions (Figure 5, arrows) whereas the α_{s1} -casein was not degraded at both pH, as proteolytic profiles of α_{s1} -casein was similar to non-proteolytic strains (data not shown).

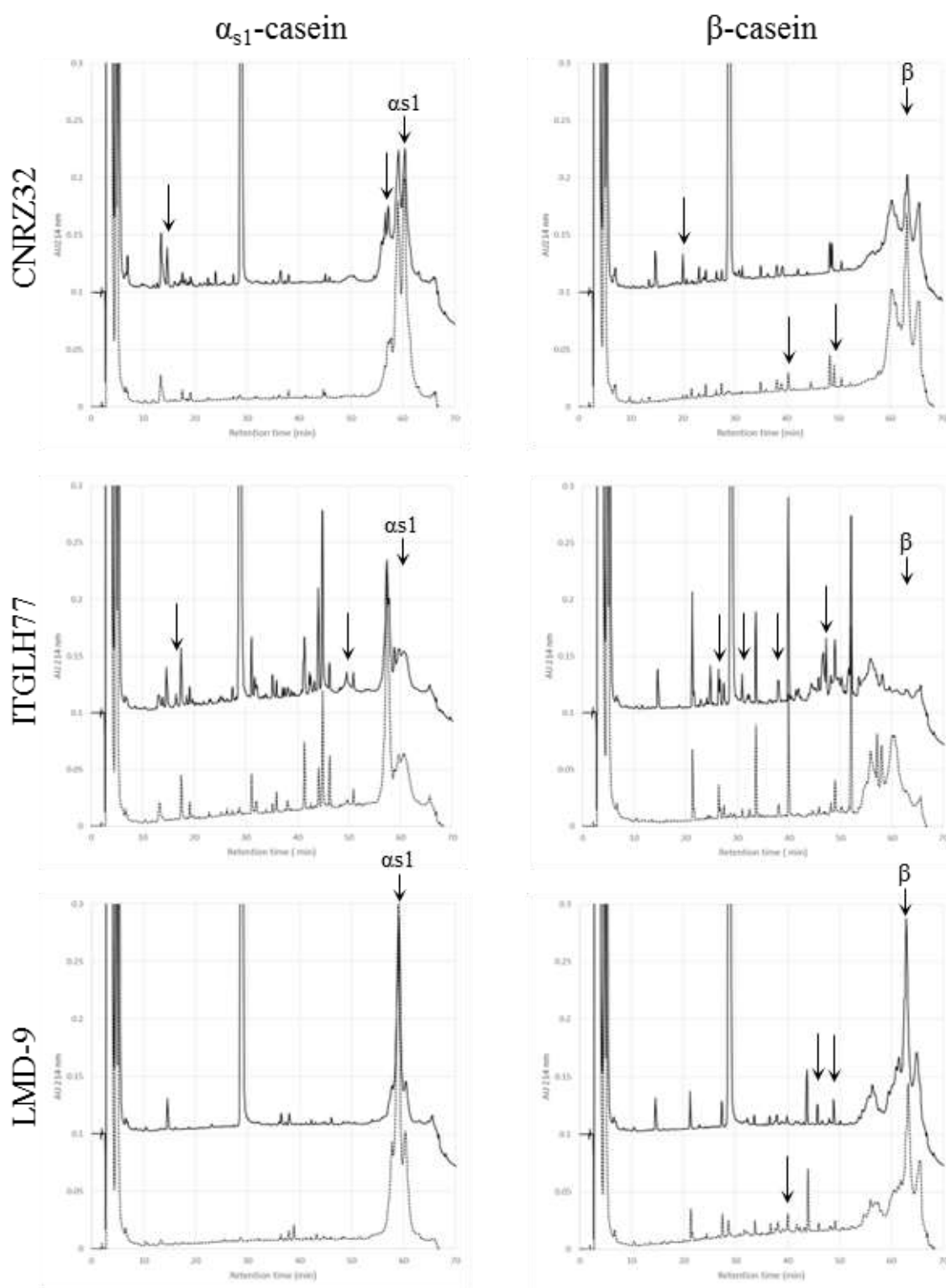


Figure 5: RP-HPLC profiles of *in vitro* hydrolysats of α_{s1} - and β -caseins after 15 minutes of incubation with *L. helveticus* strains CNRZ32 (four proteinases) and ITGLH77 (PrH3), and *S. thermophilus* strain LMD-9 (PrS). Caseins were suspended in lactate buffer at pH 5.2 (black lines) and Tris HCl buffer at pH 7.5 (dash lines). Non-degraded α_{s1} -casein and β -casein are identified on profiles by (α_{s1}) and (β) respectively.

3.4 In situ hydrolysis in mini Swiss-type cheeses

Based on *in vitro* results, mini Swiss-type cheeses were processed modifying two parameters: the *L. helveticus* strains and the NaCl concentration. Three conditions were chosen concerning the *L. helveticus* strains using CNRZ32 CIRM-BIA 103 (four proteinases), ITGLH77 (PrH3) or no *L. helveticus* strain. Three conditions were tested concerning the NaCl concentration in cheeses as N1 for regular salt concentration for Emmental cheese (corresponding to 1.5% salt/moisture), N0.5 for twice lower salt concentration, and N2 for twice higher salt concentration. Cheese making was conducted in such way that, first, the dry matter of all cheeses was kept constant regardless of the salt concentration used, and second, the expected pH 5.2 at day 1 was reached in control cheeses without *L. helveticus* strain (NoLH) thanks to the addition of supplemental lactose in milk. Cheeses were ripened for 48 days and cell counts, proteolysis indices, salt and sugar concentrations are reported in Table 4.

First of all, new technics to produce Emmental low and high NaCl levels was successfully performed as strains cultivability and cheese overall composition fitted well with data of regular level of NaCl but also with data already published with *L. helveticus* strains used as starter of Emmental cheeses (Sadat-Mekmene et al., 2013). Moreover, the overall NaCl concentration measured in the different cheeses independently of the strains used was different according to the three predicted NaCl levels after the dynamic brining used and reached at day 8, for N2 = 0.76 g NaCl/100g of cheese, for N1 = 0.32 g NaCl/100g of cheese and for N0.5 = 0.25 g NaCl/100g of cheese (Table 4). The NaCl concentration was actually increased by a factor 2.4 between N2 and the regular N1 level but was only reduced by 1.3 instead of 2 between N1 and N0.5. The NaCl concentration increased during ripening and showed at Day 48 for N2 = 1.14, N1 = 0.45; and N0.5 = 0.33 g NaCl/100g of cheese. The pH values (Table 4) also increased from 5.1 at Day 1 to 5.4 at Day 48 and as expected, NoLH cheeses were significantly at a lower pH (5.2) than cheeses manufactured with lactobacilli (5.4) ($p < 0.05$).

3.4.1 Strains cultivability

Strain cultivability presented variations according to the strain used. For ITGLH77, from day 1 to 48, a decrease in cultivability (almost 5.7 Log) was observed. Concerning the salt effect on cultivability of *L. helveticus* strain ITGLH77, no marked differences were noticed when salt was reduced. However, ITGLH77 cultivability was higher at upper salt level at Days 20 and 34 with a difference of one and two Log respectively. This difference was not observed at the end of the ripening any more.

The strain CNRZ32 cultivability decreased less than the strain ITGLH77 (only 3 Log) after 48 days of ripening. This difference in cultivability between strains was only observed at Days 34 and 48. Concerning the salt effect on CNRZ32 cultivability, no marked differences were noticed until Day 48 with a slight higher cultivability at higher salt level. Regarding both *L. helveticus* strains cultivability, they were impacted differently by ripening temperature with higher cultivability during cold room step at 12°C for ITGLHG77 than CNRZ32. In contrary, in warm room at 24°C, strain CNRZ32 cultivability was almost twice higher than ITGLH77.

The *S. thermophilus* strain ST88 cultivability varied only depending on *L. helveticus* strain presence in cheeses. A decrease of cultivability was shown in presence of *L. helveticus*, and higher decrease using CNRZ32 than that of the strain ITGLH77 ($p<0.05$). Unlike for *L. helveticus* strains, no impact of NaCl level had been observed on survival of *S. thermophilus* ST88.

Concerning the cultivability of the non-starter strain, *P. freudenreichii*, it presented almost eight fold decrease at upper NaCl compared to the population reached at lower and regular NaCl levels at the end of ripening.

Table 4: Composition of Emmental cheeses manufactured using starter strains of *S. thermophilus* ST88, *Propionibacterium freudenreichii* PALITGP20 (P20) and different *L. helveticus* strains CNRZ32 CIRM-BIA 103 (CNRZ32) or ITGLH77 (n=3) or without *L. helveticus* strain (n = 2). Three salt conditions were tested with N1 for regular salt concentration for Emmental cheese, N0.5 for twice less salt concentration, and N2 corresponding to twice higher salt concentration. The cheese composition was measured throughout the 48 days of ripening at Days 1, 8, 20, 34 and 48.

Ripening time (Days)	Cold room (12°C)						Warm room (24°C)								
	D1			D8			D20			D34			D48		
	N2	N1	N0.5	N2	N1	N0.5	N2	N1	N0.5	N2	N1	N0.5	N2	N1	N0.5
lactobacilli strain CNRZ32															
ST88 (Log ₁₀ cfu/g cheese)	8.47 ± 0.04	8.15 ± 0.34	8.49 ± 0.01	8.63 ± 0.09	8.24 ± 0.07	8.37 ± 0.11	8.09 ± 0.11	7.68 ± 0.13	7.89 ± 0.25	6.75 ± 0.13	5.95 ± 0.08	6.37 ± 0.33	5.84 ± 0.02	4.97 ± 0.11	5.13 ± 0.17
LH (Log ₁₀ cfu/g cheese)	8.74 ± 0.01	8.40 ± 0.36	8.83 ± 0.02	7.16 ± 0.07	7.25 ± 0.40	7.51 ± 0.07	6.61 ± 0.28	7.41 ± 0.17	6.88 ± 0.35	5.73 ± 0.15	5.83 ± 0.17	6.14 ± 0.10	5.94 ± 0.11	5.42 ± 0.18	5.60 ± 0.09
P20 (Log ₁₀ cfu/g cheese)	5.00 ± 0.07	4.60 ± 0.30	4.84 ± 0.08	ND	ND	ND	5.01 ± 0.02	4.91 ± 0.08	5.00 ± 0.04	6.46 ± 0.18	6.80 ± 0.23	6.16 ± 0.19	7.98 ± 0.22	8.82 ± 0.10	8.55 ± 0.08
pH	5.13 ± 0.05	5.07 ± 0.00	5.05 ± 0.03	ND	ND	ND	5.31 ± 0.02	5.38 ± 0.03	5.48 ± 0.02	5.39 ± 0.00	5.43 ± 0.02	5.34 ± 0.02	5.38 ± 0.05	5.49 ± 0.02	5.49 ± 0.02
Salt (g NaCl/100g)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0.67 ± 0.02	0.32 ± 0.01	0.24 ± 0.02	0.69 ± 0.03	0.35 ± 0.00	0.26 ± 0.03	0.92 ± 0.02	0.37 ± 0.02	0.29 ± 0.01	0.98 ± 0.04	0.42 ± 0.01	0.32 ± 0.03
Galactose (g/100g)	< 0.20	< 0.20	< 0.20												
SN/TN (%)	6.40 ± 0.11	6.47 ± 0.12	6.59 ± 0.11	6.37 ± 0.03	6.67 ± 0.18	7.08 ± 0.13	7.47 ± 0.07	8.27 ± 0.16	8.05 ± 0.32	12.89 ± 0.07	14.36 ± 0.46	13.22 ± 0.08	16.35 ± 0.35	19.74 ± 0.61	18.88 ± 0.25
NPN/TN (%)	2.68 ± 0.04	2.74 ± 0.07	2.78 ± 0.12	3.17 ± 0.05	3.16 ± 0.13	3.48 ± 0.05	4.30 ± 0.12	4.48 ± 0.18	4.64 ± 0.08	8.55 ± 0.06	9.27 ± 0.46	8.86 ± 0.09	12.35 ± 0.15	14.19 ± 0.35	13.72 ± 0.33
NPN/SN (%)	41.90 ± 0.49	42.40 ± 1.38	42.11 ± 1.15	49.82 ± 0.64	47.59 ± 2.84	49.13 ± 0.44	57.52 ± 1.29	54.23 ± 2.01	57.66 ± 1.33	66.29 ± 0.14	64.48 ± 1.39	67.04 ± 1.05	75.59 ± 0.85	71.89 ± 0.53	72.64 ± 0.96
β-CN (%CN/TN)	28.98 ± 0.86	29.37 ± 0.95	28.05 ± 0.33	25.87 ± 0.21	25.51 ± 0.18	24.44 ± 1.31	25.23 ± 0.66	24.04 ± 1.02	24.34 ± 0.57	22.71 ± 0.62	21.07 ± 0.52	21.26 ± 0.37	17.02 ± 1.22	12.4 ± 1.00	14.47 ± 0.39
α _{S2} -CN (%CN/TN)	5.80 ± 0.25	5.71 ± 0.29	6.17 ± 0.52	6.62 ± 0.41	5.72 ± 1.01	6.78 ± 0.67	4.10 ± 0.55	4.86 ± 0.31	3.62 ± 0.12	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
α _{S1} -CN (%CN/TN)	45.24 ± 0.35	47.80 ± 0.39	46.43 ± 0.45	41.2 ± 0.65	42.13 ± 1.41	39.55 ± 0.72	42.41 ± 1.56	36.97 ± 2.35	36.41 ± 1.25	28.83 ± 2.72	31.82 ± 0.74	32.74 ± 0.54	23.8 ± 1.41	20.94 ± 0.89	21.34 ± 0.65
lactobacilli strain ITGLH77															
ST88 (Log ₁₀ cfu/g cheese)	8.49 ± 0.02	8.32 ± 0.06	8.37 ± 0.05	8.42 ± 0.09	8.33 ± 0.09	8.45 ± 0.05	8.22 ± 0.06	8.28 ± 0.05	8.09 ± 0.03	7.64 ± 0.17	7.35 ± 0.08	7.17 ± 0.07	7.05 ± 0.14	6.44 ± 0.13	6.14 ± 0.11
LH (Log ₁₀ cfu/g cheese)	9.16 ± 0.03	9.07 ± 0.08	9.12 ± 0.04	8.46 ± 0.03	8.52 ± 0.14	ND	8.34 ± 0.04	7.57 ± 0.26	7.51 ± 0.12	5.72 ± 0.51	3.75 ± 0.13	3.28 ± 0.16	3.66 ± 0.17	3.48 ± 0.19	3.11 ± 0.01
P20 (Log ₁₀ cfu/g cheese)	4.54 ± 0.02	4.82 ± 0.06	4.77 ± 0.05	ND	ND	ND	4.82 ± 0.08	4.92 ± 0.05	4.85 ± 0.05	5.09 ± 0.31	6.06 ± 0.23	6.73 ± 0.22	7.41 ± 0.44	8.37 ± 0.10	8.79 ± 0.09
pH	5.13 ± 0.01	5.07 ± 0.01	5.03 ± 0.02	ND	ND	ND	5.34 ± 0.01	5.32 ± 0.00	5.38 ± 0.02	ND	ND	5.40 ± 0.01	5.41 ± 0.04	5.40 ± 0.02	5.45 ± 0.02
Salt (g NaCl/100g)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0.64 ± 0.01	0.29 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.92 ± 0.08	0.36 ± 0.02	0.29 ± 0.01	1.16 ± 0.09	0.44 ± 0.02	0.33 ± 0.01	1.08 ± 0.13	0.45 ± 0.02	0.31 ± 0.01
Galactose (g/100g)	< 0.20	< 0.20	< 0.20												
SN/TN (%)	4.96 ± 0.04	5.06 ± 0.04	4.31 ± 0.11	5.50 ± 0.10	5.71 ± 0.26	5.82 ± 0.05	7.08 ± 0.14	7.97 ± 0.17	6.92 ± 0.12	10.18 ± 0.11	11.84 ± 0.08	12.46 ± 0.14	15.16 ± 0.59	16.61 ± 0.15	18.28 ± 0.42
NPN/TN (%)	1.79 ± 0.03	1.79 ± 0.03	1.45 ± 0.04	2.15 ± 0.12	2.24 ± 0.03	2.32 ± 0.03	2.84 ± 0.06	3.17 ± 0.09	2.83 ± 0.11	5.00 ± 0.03	5.59 ± 0.03	5.57 ± 0.10	7.49 ± 0.32	8.34 ± 0.11	9.39 ± 0.21
NPN/SN (%)	36.05 ± 0.66	35.33 ± 0.81	33.60 ± 0.86	39.25 ± 2.79	39.39 ± 2.15	39.92 ± 0.88	40.20 ± 1.21	39.77 ± 0.73	40.86 ± 0.86	49.16 ± 0.3	47.23 ± 0.49	44.72 ± 1.30	49.43 ± 0.57	50.22 ± 1.03	51.41 ± 0.87
β-CN (%CN/TN)	25.47 ± 1.20	26.20 ± 0.61	26.06 ± 0.53	27.27 ± 3.46	25.93 ± 0.93	27.31 ± 0.74	27.79 ± 1.14	24.45 ± 1.05	23.15 ± 0.97	24.34 ± 1.04	24.83 ± 1.05	20.51 ± 0.48	18.83 ± 0.04	16.87 ± 0.84	14.72 ± 0.92
α _{S2} -CN (%CN/TN)	6.30 ± 0.89	6.36 ± 0.55	5.58 ± 0.57	4.09 ± 0.13	4.02 ± 0.17	3.80 ± 0.28	4.15 ± 0.32	3.68 ± 0.18	4.03 ± 0.27	0 ± 0	0 ± 0	ND	0 ± 0	ND	0 ± 0
α _{S1} -CN (%CN/TN)	43.82 ± 0.64	43.45 ± 1.16	43.99 ± 1.19	44.17 ± 3.59	43.75 ± 0.7	36.45 ± 0.06	39.15 ± 1.54	40.04 ± 2.23	32.54 ± 1.36	33.71 ± 0.84	30.85 ± 0.56	30.23 ± 1.03	23.11 ± 3.04	19.95 ± 1.55	23.78 ± 0.47
No lactobacilli strain															
ST88 (Log ₁₀ cfu/g cheese)	8.81 ± 0.01	8.98 ± 0.11	8.47 ± 0.09	8.59 ± 0.13	8.61 ± 0.02	8.59 ± 0.09	8.73 ± 0.08	8.58 ± 0.09	8.46 ± 0.04	8.35 ± 0.00	8.44 ± 0.01	8.40 ± 0.07	7.97 ± 0.21	7.74 ± 0.10	7.97 ± 0.18
LH (Log ₁₀ cfu/g cheese)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P20 (Log ₁₀ cfu/g cheese)	4.44 ± 0.03	4.51 ± 0.06	4.21 ± 0.11	ND	ND	ND	4.70 ± 0.08	4.62 ± 0.07	4.49 ± 0.10	4.24 ± 0.24	5.20 ± 0.23	5.11 ± 0.03	4.00 ± 0.00	7.29 ± 0.07	6.69 ± 0.54
pH	5.04 ± 0.01	5.14 ± 0.00	5.12 ± 0.01	5.16 ± 0.04	5.30 ± 0.00	5.27 ± 0.04	5.24 ± 0.02	5.32 ± 0.05	5.35 ± 0.04	5.19 ± 0.01	5.33 ± 0.01	5.39 ± 0.06	5.20 ± 0.02	5.26 ± 0.08	5.34 ± 0.01
Salt (g NaCl/100g)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1.07 ± 0.15	0.36 ± 0.06	0.23 ± 0.00	1.05 ± 0.04	0.44 ± 0.05	0.26 ± 0.01	1.30 ± 0.01	0.43 ± 0.05	0.30 ± 0.02	1.46 ± 0.08	0.51 ± 0.10	0.36 ± 0.05
Galactose (g/100g)	1.00 ± 0.03	0.96 ± 0.02	0.95 ± 0.01												
SN/TN (%)	4.33 ± 0.09	4.21 ± 0.37	4.56 ± 0.17	4.77 ± 0.27	5.72 ± 0.07	5.66 ± 0.45	5.74 ± 0.01	6.08 ± 0.38	6.67 ± 0.54	9.26 ± 0.23	11.35 ± 0.19	11.80 ± 0.78	11.70 ± 0.18	15.32 ± 0.59	15.76 ± 0.78
NPN/TN (%)	0.90 ± 0.21	1.12 ± 0.05	1.04 ± 0.05	1.38 ± 0.08	1.38 ± 0.01	1.41 ± 0.01	2.00 ± 0.06	1.95 ± 0.13	1.86 ± 0.02	3.35 ± 0.05	3.94 ± 0.26	4.12 ± 0.11	4.83 ± 0.23	6.05 ± 0.05	5.97 ± 0.13
NPN/SN (%)	20.80 ± 4.33	26.75 ± 1.13	22.97 ± 1.89	28.97 ± 0.01	24.20 ± 0.20	25.02 ± 1.74	34.78 ± 0.90	32.1 ± 0.15	27.97 ± 1.92	36.21 ± 1.49	34.72 ± 1.73	34.99 ± 1.41	41.30 ± 2.60	39.56 ± 1.85	37.94 ± 1.08
β-CN (%CN/TN)	27.74 ± 0.07	24.38 ± 1.00	26.05 ± 1.67	25.66 ± 0.64	24.18 ± 0.31	26.46 ± 1.15	24.08 ± 0.61	23.43 ± 0.42	22.96 ± 0.69	21.96 ± 0.13	19.99 ± 0.62	19.54 ± 1.10	17.34 ± 5.13	16.44 ± 1.38	16.10 ± 1.50
α _{S2} -CN (%CN/TN)	5.12 ± 0.23	5.31 ± 0.41	5.11 ± 0.53	5.24 ± 0.11	4.29 ± 0.71	4.95 ± 0.21	6.17 ± 0.24	4.56 ± 0.35	4.94 ± 0.25	3.68 ± 0.33	2.70 ± 0.40	2.83 ± 0.82	0 ± 0	ND	0 ± 0
α _{S1} -CN (%CN/TN)	45.21 ± 1.52	43.31 ± 2.75	43.56 ± 2.26	45.33 ± 2.22	45.96 ± 0.93	ND	38.27 ± 2.63	40.57 ± 0.21	39.80 ± 0.37	29.63 ± 0.15	29.62 ± 3.88	25.15 ± 1.19	33.64 ± 0.11	29.44 ± 2.87	27.84 ± 0.3

Counts of *S. thermophilus* (ST88), *L. helveticus* (LH) and *Propionibacterium freudenreichii* (P20) are presented in Log₁₀ cfu/g cheese; SN/TN = pH 4.6-soluble Nitrogen (N) as a percentage of total N; NPN/TN = 12% TCA-soluble N as a percentage of total N; NPN/SN = 12% TCA-soluble N as a percentage of pH 4.6-soluble N; CN/NT = intact casein as a percentage of total N. ND correspond to not determined values.

3.4.2 Cheese proteolysis

Cheese proteolysis was impacted mainly by *L. helveticus* strains and weakly by various salt concentrations as shown from principal component analysis (PCA) (Figure 6). This analysis was performed using casein hydrolysis, SN/TN, NPN/TN data, *S. thermophilus* ST88 and *P. freudenreichii* (P20) counts, pH, and NaCl and chloride concentrations data. The first two dimensions components together accounted for 65.5%, 58.21%, 62.05% and 70.92 % of the total variability at D1, D8, D20 and D48 respectively. The PC1 is mainly related to proteolytic parameters and the PC2 axis is more related to salt. Thus, the three types of cheeses were clearly distinguished according to the type of strains used for cheese making regardless of the ripening time (Figure 6). At the end of the ripening time, *L. helveticus* CNRZ32 cheeses forms a clear separated group compared to ITGLH77 and NoLH cheeses. The impact of the salt concentration on the distribution of the cheese on the PCA is only effective with the upper salt. From D8 to D48 of ripening, upper levels of NaCl (N2) became clearly separated from cheeses with regular (N1) and lower (N0.5) levels of NaCl regardless of the strains.

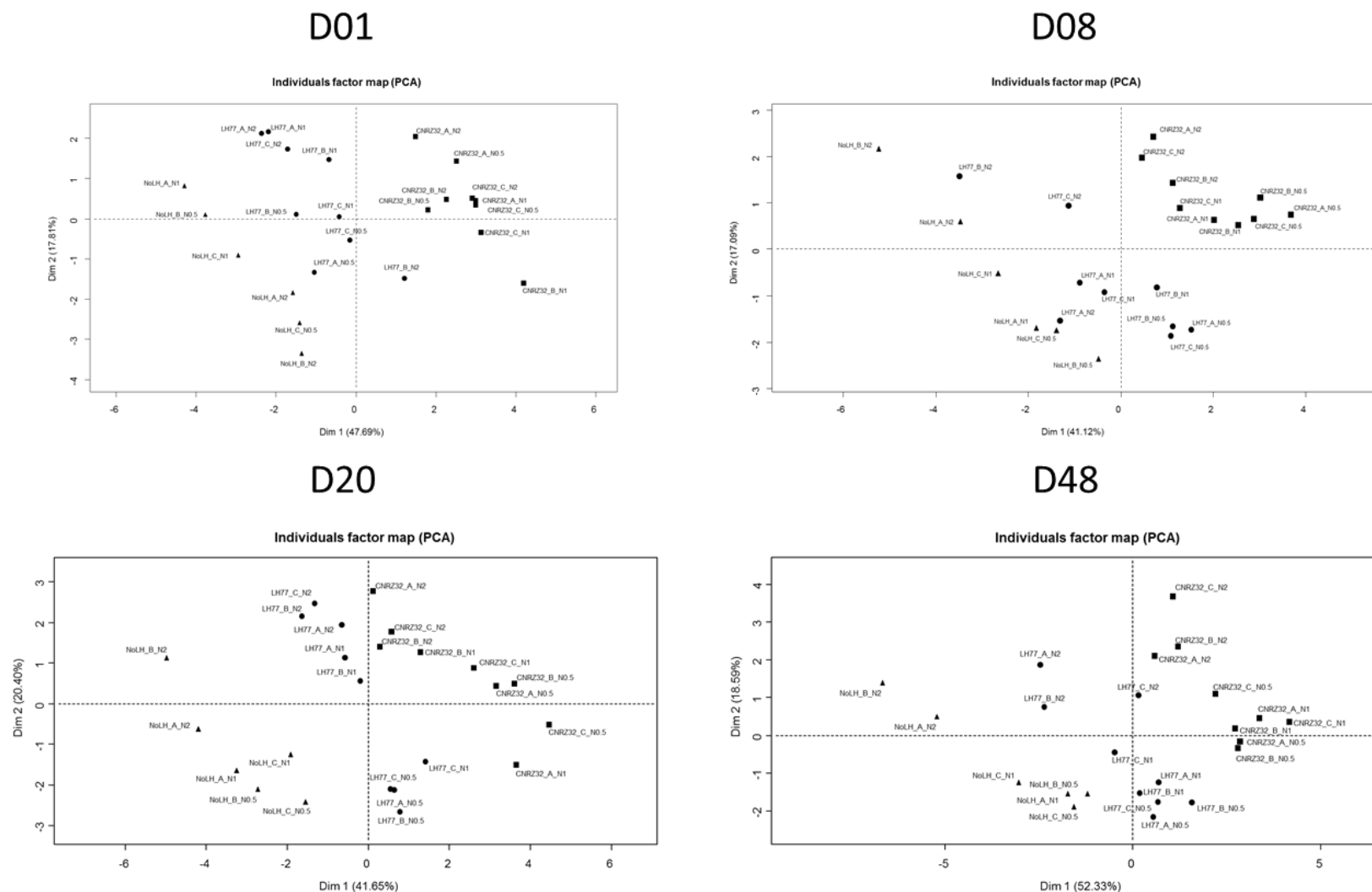


Figure 6 : Individual factor map generated from principal component analysis presenting two first principal components (PC) of proteolytic data at days 1, 8, 20 and 48 (D01, D08, D20 and D48) of Emmental cheeses manufactured using the strains of *L. helveticus* CNRZ32 CIRM-BIA 103 (CNRZ32) or ITGLH77 CIRM-BIA 99 (LH77) or without *L. helveticus* strain (NoLH). Three salt conditions were tested with N1 for usual salt concentration for Emmental cheese, N0.5 for twice less usual salt concentration, and N2 corresponding to twice higher usual salt concentration. Three replicates (A, B and C) were performed for each salt concentration and *L. helveticus* strains used. NoLH cheeses were replicated only twice.

The proteolysis of caseins was analysed first by α_{s1} -, α_{s2} - and β -casein degradation, second by production of soluble peptides at pH 4.6 (SN/TN) and third the production of small peptide soluble in TCA12 % (NPN/TN) as reported in Table 4. To complete these observations, peptide profiles were also observed by RP-HPLC on water extract of Emmental cheeses (Figure 6).

Regarding the casein proteolysis, β -casein was more degraded than α_{s1} -casein in all cheese conditions along 48 days of ripening. At Day 1, α_{s1} - and β -caseins were both slightly more degraded in cheeses with *L. helveticus* strain ITGLH77 and NoLH cheeses with *S. thermophilus* than in *L. helveticus* strain CNRZ32 cheeses ($p<0.05$). At Day 48, No significant differences in β -casein proteolysis was observed between strains ($p<0.05$) but α_{s1} -casein proteolysis was 27% lower in NoLH cheeses than in cheeses manufactured with lactobacilli strains. The NaCl level did not have any effect on β -casein proteolysis but α_{s1} -casein proteolysis was slightly lower ($p<0.05$) at high NaCl level (N2). It is noticeable that at Days 8 and 20, regardless the starter used, α_{s1} -casein proteolysis was higher at N0.5 NaCl level ($p<0.05$) but this significant difference was no more observed later in the ripening. Likewise, β -casein proteolysis slightly varied during the ripening ($p<0.05$) but was lower at N2 level.

Regarding the production of peptides throughout ripening time, the values of SN/TN of cheeses manufactured with CNRZ32 were significantly higher than those of cheeses manufactured with ITGLH77 and NoLH ($p<0.05$). However, these differences gradually decreased throughout ripening, and greatly between CNRZ32 and ITGLH77 cheeses from 26% (Day 1) to 9% (Day 48) than between CNRZ32 and NoLH cheeses from 33% (Day 1) to 22% (Day 48).

The NPN/TN values, corresponding to the percentage of small peptides production in cheeses, increased up to 80% along cheeses ripening whatever the starter used or the NaCl level. However, throughout ripening, a constant cleavage was observed regarding starter used with significantly highest proteolysis observed for CNRZ32 cheeses, then ITGLH77 cheeses and finally NoLH cheeses ($p<0.05$). For example, at day 1, production of small peptides (NPN/TN) in CNRZ32 cheeses was 39% and 63% more than ITGLH77 and NoLH cheeses respectively. At Day 48, small peptides production (NPN/TN) showed also a significant higher amount of peptides produced in CNRZ32 cheese ($p<0.05$) with 37% and 58% more than ITGLH77 and NoLH cheeses. Regarding the NaCl influence on small peptides

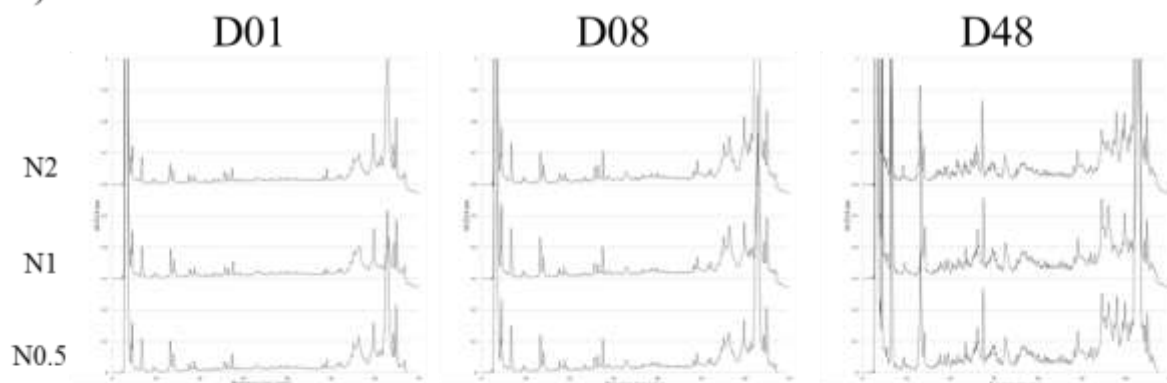
production, the upper NaCl level (N2) globally decreased around 16% the peptides production.

The NPN/SN ratio was used to estimate the distribution of the small peptides into the the soluble peptide fraction throughout ripening. Thus, the overall proteolysis was lower in NoLH cheeses than in other cheeses manufactured with *L. helveticus* strains, confirming the highest proteolytic activity of this species compared to *S. thermophilus* used as sole starter. Notably, NaCl levels did not impact significantly ($p < 0.05$) the NPN/SN ratio throughout ripening.

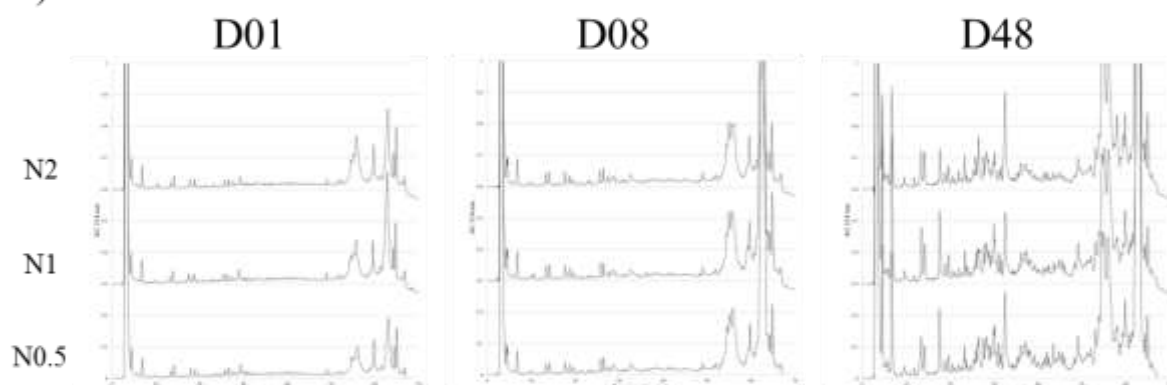
The small peptide production (NPN/NT) increased slightly above 40% in CNRZ32 and NoLH cheeses, whereas in ITGLH77 cheeses, the increase reached only 31%. Proteolysis at D48 cheeses manufactured with lactobacilli strains were more proteolytic than in NoLH cheeses with 46% and 21% more proteolysis in CNRZ32 and ITGLH77 cheeses respectively than in NoLH cheeses.

To complete the overview of proteolysis, proteolytic profiles of the cheese water extract were shown as a qualitative view of the proteolysis at days 1, 8 and 48 in Figure 7. The chromatographic profile was different according to the type of strain used: more hydrophilic peptides were produced at D8 in cheese water extract of CNRZ32 cheese than for ITGLH77 cheese. For NoLH cheeses, no clear variations of the peptide profiles according to the different salt concentrations were observed. However, at Day 48, peptidic profiles were specific to starter strains used for cheeses manufacture independently of the NaCl level used.

A) CNRZ32 cheeses



B) ITGLH77 cheeses



C) NoLH cheeses

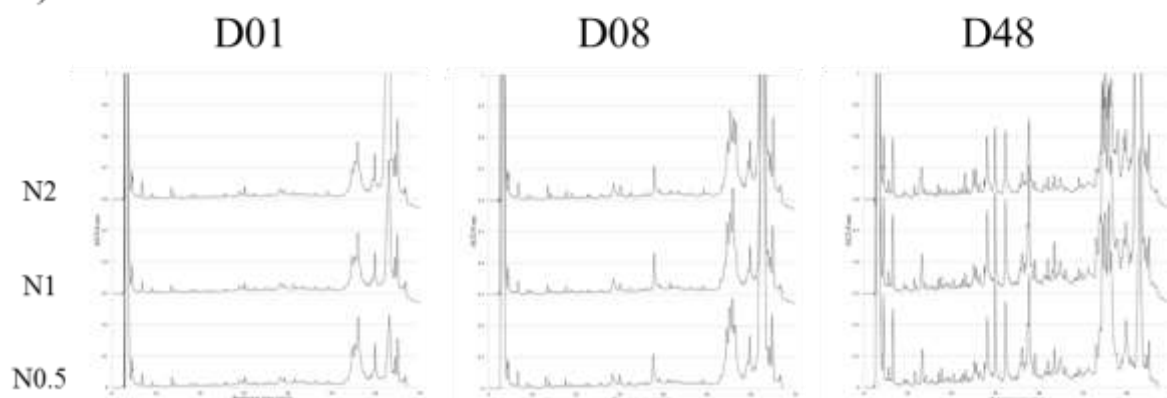


Figure 7 : RP-HPLC profiles of aqueous extract from Emmental cheese produced with *L. helveticus* strains A) CNRZ32 CIRM-BIA 103 (four proteinases), B) ITGLH77 (PrH3) or C) without *L. helveticus* strains (NoLH). Cheeses were processed with three different salt concentrations as N1 for usual salt concentration for Emmental cheese, N0.5 for twice less usual salt concentration, and N2 corresponding to twice higher usual salt concentration. Proteolysis was compared for Day 1 (D01) and Day 8 (D08) during the ripening in cold room (12°C) and at Day 48 (D48) of ripening after 28 days in warm room (24°C).

3.4.3 Activity of CEPs in cheese

The CEPs activity could also be deduced from proteolysis values (casein proteolysis, SN/TN, NPN/TN and NPN/SN) observed at Day 1. Indeed, as a decrease of almost one Log_{10} of UFC/g cheese was observed for *L. helveticus* strains at Day 8, suggesting an early start of lysis for *L. helveticus* cells, it was difficult to detect in cheese only the CEPs specific activity except at Day 1, when the starters finished their growth. Regarding the degradation of α_{s1} - and β -caseins, significant differences even slight were observed between *L. helveticus* strains CNRZ32 and ITGLH77 and *S. thermophilus* in NoLH cheeses: caseins were slightly less degraded in CNRZ32 cheeses ($p < 0.05$). The soluble peptides (SN/TN) presented differences between *L. helveticus* strains and *S. thermophilus* strain with higher hydrolysis in CNRZ32 cheeses up to 39% and 63% more than in ITGLH77 and NoLH cheeses respectively ($p < 0.05$). Concerning the small peptides production on the generated peptides (NPN/SN), although CNRZ32 appeared to be slightly less proteolytic; its small peptides production was higher than other strains as described below with NPN/TN and NPN/SN ratios. Finally, peptide profiles (Figure 7) at Day 1 presented also a slightly higher proteolysis in CNRZ32 cheeses. Although no clear variations of peptide profiles were observed, at Day 1, CNRZ32 cheeses presented slightly more hydrophilic peptides compared to ITGLH77 and NoLH cheeses.

3.4.4 Textural parameters of cheese

Finally, four textural parameters of cheeses were also observed after 48 days of ripening, (Table 5): extrusion, flowability, fat oiling off and stretchability. First of all, the flowability and the extrusion parameters did not differ regarding the strain used for cheese making ($p < 0.05$). However, the upper salt level increased flowability and extrusion of cheeses ($p < 0.05$). The fat oiling off was higher for cheeses with lactobacilli strains than in NoLH cheeses. Furthermore, the fat oiling off was higher for CNRZ32 cheeses than for ITGLH77 cheeses ($p < 0.05$). Moreover, for these cheeses, the fat oiling off was higher for regular and upper salt levels ($p < 0.05$). Finally, the stretchability was strain dependant with higher values obtained for CNRZ32 cheeses than for ITGLH77 cheeses ($p < 0.05$). The low stretchability observed for NoLH cheeses was not impacted by salt level. However, salt levels impacted differently the stretchability of cheeses regarding the lactobacilli strain. Indeed, higher stretchability was observed at lower salt level for CNRZ32 whereas for ITGLH77 strain the stretchability was higher at high salt level.

Table 5: Textural parameters of Emmental cheeses manufactured using starter strains of *S. thermophilus* ST88, *Propionibacterium freudenreichii* PALITGP20 and different *L. helveticus* strains CNRZ32 CIRM-BIA 103 (CNRZ32) or ITGLH77 (n=3) or without *L. helveticus* strain (NoLH) (n = 2). Three salt conditions were tested with N1 for regular salt concentration for Emmental cheese, N0.5 for twice less usual salt concentration, and N2 corresponding to twice higher usual salt concentration. These cheeses were evaluated at day 48 of ripening.

Cheeses NaCl level	CNRZ32			ITGLH77			NoLH		
	N2	N1	N0.5	N2	N1	N0.5	N2	N1	N0.5
Stretchability (mm)	625.17 ^b	642.17 ^b	833.00 ^a	607.33 ^b	471.17 ^{bc}	397.00 ^c	402.75 ^c	303.75 ^c	356.75 ^c
Flowability	2.77 ^a	2.41 ^a	2.21 ^a	2.417 ^a	2.23 ^a	2.15 ^a	2.27 ^a	2.06 ^a	2.22 ^a
Fat oiling off (%)	13.75 ^{ab}	14.17 ^a	12.58 ^d	13.33 ^{bc}	13.17 ^c	12.00 ^e	11.00 ^f	11.25 ^f	12.38 ^{de}
Extrusion (kgF)	10.18 ^{ab}	10.53 ^a	7.68 ^b	10.06 ^{ab}	8.83 ^{ab}	7.92 ^b	8.31 ^{ab}	5.62 ^c	5.17 ^c

^{a,b,c,d,e,f}Means (n = 3 CNRZ32, ITGLH77 and n=2 NoLH) within a row with no common superscripts differ (P<0.05).

4 Discussion

Among the lactic acid bacteria, *L. helveticus* possesses an efficient proteolytic system able to hydrolyse milk caseins. It possesses up to four CEP genes named *prtH*, *prtH2*, *prtH3* and *prtH4* (Pederson et al., 1999; Genay et al., 2009; Broadbent et al., 2011). However, the distinction between each proteinase activity and specificity is up to now incomplete. Indeed, to the best of our knowledge, no comparisons of proteolytic activity of lactobacilli were already published between *in vitro* and cheese environments. Regarding PrtS of *S. thermophilus*, more information were already obtained on this CEP but some aspects still remain unknown as its specific activity at pH 5.2, corresponding to pH after brining of the Emmental cheese.

4.1 Strains characteristics and CEP expressions

Therefore, five strains of *L. helveticus* were used in this study: the strain CNRZ32 CIRM-BIA 103 which possesses four CEP genes: *prtH*, *prtH2*, *prtH3*, and *prtH4* (Broadbent et al., 2011) and four other *L. helveticus* strains which were predicted to possess either only one CEP such as UPR14 (*prtH*), ITGLH77 CIRM-BIA 99 (*prtH3*) and R0052 (*prtH4*) strains, or none CEP as CNRZ328 CIRM-BIA 110 (Genay et al., 2009; Sadat-Mekmene et al., 2011b; Broadbent et al., 2011). For the other lactic acid bacterium species, *S. thermophilus* LMD-9, which harbours the PrtS CEP and its isogenic mutant, PrtS⁻, in which the *prtS* gene has been deleted, were used (Lecomte et al., 2014). At a first point, we showed that the CEPs genes were actually present in the different *L. helveticus* strains by PCR, and that corresponding CEPs were produced at the cell surface by shaving (Figure 1 and Table 2). However, as strains possessing only *prtH2* were not able to grow in milk, maybe because they came from whiskey fermentation (Cachat and Priest, 2005; Broadbent et al., 2011), no information on the proteolytic activity of this peculiar CEP could be obtained. Surprisingly, the *L. helveticus* UPR14 strain harbouring PrtH was also not able to grow in milk, although this strain came from natural whey starter of Parmigiano Reggiano cheese. No shavings were performed on of *S. thermophilus* strains as the PrtS presence on the cell surface of strain LMD-9 and its absence in PrtS⁻ mutant were already shown in previous study (Lecomte et al., 2014).

Shaving was performed after growth in milk medium in which CEPs activities was already shown to be significantly higher than in MRS medium (Sadat-Mekmene et al., 2011b). Regarding PrtH3, the number of identified peptides was 4 to 5 folds higher than the

other CEPs (table 3). As shaving can be considered as a semi-quantitative method, this difference could be explained by either a higher expression of PrtH3 or a greater accessibility of PrtH3 by trypsin on the cell surface. The first hypothesis is reinforced by the fact that emPAI of PrtH3 was among the highest compared to the emPAI of PrtH, PrtH2 and PrtH4 in *L. helveticus* CNRZ32 strain.

Among the identified peptides, no peptides belonging to the signal sequence of CEPs were detected by shaving. Indeed, this N-terminal domain is generally cleaved during the secretion of the protein by the sec system (Schneewind and Missiakas, 2012). The first identified peptide (DANGVELPANNQDHVK) (Table 3), located at positions D₁₂₂ to K₁₃₇ at the N-terminal extremity of PrtH3 amino acid sequence, was both identified in *L. helveticus* strains CNRZ32 CIRM-BIA 103 and ITGLH77 CIRM-BIA 99. No limitation between the pro-peptide and the catalytic domains had been already proposed. Thus we proposed to define this limitation *in silico* by homology with PrtH2 (Genay et al., 2009), as PrtH3 is highly similar to PrtH2 (Broadbent et al, 2011). Thus, the N-terminal extremity of the catalytic domain should start at N₁₃₁ which is located in the identified tryptic peptide (underlined in the following sequence DANGVELPANNQDHVK). This observation brings information on the mature state of PrtH3 indicating that the pro-peptide was still attached to the whole CEP. This could indicate that PrtH3 could be present at the cell surface as a mature and immature form, but the pro-peptide border area should be well confirmed in further experiments. This dual maturation state of CEPs was also recently found for PrtS in *S. thermophilus* LMD-9 (Lecomte et al., 2014). As PrtS was known to be active (Dandoy et al., 2011) and as a peptide specific to the mature form of the CEP has been also detected in the same shaving sample, they proposed that the both forms (mature and immature) coexist at the cell surface of *S. thermophilus*. In the case of PrtH2, the identified peptide only belonging to the N-terminal pro-peptide of PrtH2 (DAQAPSDDKQPDPVVQK) raises the question about PrtH2 maturation and only allows establishing that immature form of PrtH2 had been detected on the cell surface of the strain CNRZ32 CIRM-BIA 103 during exponential growth in milk. Until now, no evidences were found about PrtH2 activity on the cell surface. Concerning PrtH and PrtH4, identified peptides do not allow any indications on their maturation state.

The milk acidification rate by the *L. helveticus* strains CNRZ32, ITGLH77, UPR14 and R0052 (Table 2), was strain dependent with two fast acidifying strains, *L. helveticus* CNRZ32 and ITGLH77 (0.37 and 0.27 UpH.h⁻¹) in agreement with results of Sadat-Mekmene et al. (2011b), two weak acidifying strains, *L. helveticus* CNRZ328 CIRM-BIA 110 (0.23 ± 0.01 UpH.h⁻¹) and R0052 (0.09 UpH.h⁻¹), and no acidification in presence of UPR14.

The question remains whether a relationship exists between the acidification rate and the presence or the activity of the CEPs.

4.2 *In vitro* proteolysis

As shown by Sadat-Mekmene et al. (2011b), the *L. helveticus* strains hydrolysed extensively and rapidly purified β -casein and more differences were observed between strains regarding the hydrolysis of purified α_{s1} -casein. In our study, two other parameters were tested to have more information on the capability of CEPs to hydrolyse caseins, *i.e.* pH and salt concentration. Thus, it clearly appeared that at pH 5.2, corresponding to the pH after brining in Swiss-type cheeses, the CEP activity was greatly increased for all strains and on both caseins compared to pH 7.5 usually used for *in vitro* experiments. A higher activity was shown for *L. helveticus* strains expressing PrtH3 alone as for ITGLH77 strain and in presence of the other CEPs as for CNRZ32 strain, and lower one for *S. thermophilus* LMD-9 (PrtS). Finally quite no hydrolysis of both caseins was observed for *L. helveticus* R0052 strain harbouring only PrtH4 (Figure 4). This difference in activity was also accompanied by a qualitative peptide profiles that varied between both pH conditions (Figure 3), suggesting a various accessibility of the caseins by the CEPs, due to conformational changes either of the CEPs or of the caseins. In literature, change in CEP activity according to the pH was mainly studied on PrtP of *Lc. lactis* and more precisely on α_{s1} -casein (1-23) peptide and on primary cheese peptides obtained after hydrolysis of α_{s1} - and β -caseins by chymosin (Mulvihill and Fox, 1978; Exterkate and Alting, 1993; Exterkate et al., 1995, 2001). At pH 5.2 and whatever the salt concentration (0 or 4% of NaCl), differences in specificity between both types of proteinases (P_I and P_{III}) were observed. Indeed, for both types of proteinases fewer bounds of α_{s1} -casein (1-23) peptide were hydrolysed at lower pH and in presence of salt than at pH 6.5 and absence of salt. However, the difference of specificity between CEP types was largely abolished at pH 6.5 and low salt concentration due to lower electrostatic forces (Exterkate and Alting, 1993). Mulvihill and Fox (1978) also showed a higher efficiency at pH 5.2 compared to higher pH on α_{s1} - and β -caseins for other type of enzymes used in dairy products like chymosin.

Such a difference between CNRZ32 and ITGLH77 strains, both harbouring PrtH3, could be explained by the difference of quantity of active PrtH3 at the cell surface. Indeed, even if cells were concentrated at the same OD₆₀₀, the cell number and the active CEPs at the

cell surface could be different. The number of active PrtH3 in the *L. helveticus* ITGLH77 strain seemed to be higher than in *L. helveticus* CNRZ32 strain for which the maximum of degradation rate was twice lower. However, at low salt concentration, *L. helveticus* CNRZ32 strain hydrolysed α_{s1} -casein at the same rate than *L. helveticus* ITGLH77 strain for which the degradation rates was decreased at lower salt concentration. This could be due to a difference in cell surface environment between both strains with the presence of the other CEPs in *L. helveticus* CNRZ32 that can favour substrate capture for example.

Among the salt concentrations used for 0 to 4.5 % NaCl in moisture, only NaCl concentration, above 1.5% NaCl/moisture decreased the CEP activities for all strains and on both caseins (Figure 3). This was in agreement results obtained on PrtP activity of *Lc lactis* by Exterkate et al. (1993) between NaCl 0 or 4% (w/v). In our work, intermediate concentrations of NaCl were tested and showed that below NaCl 1 (1.5% NaCl/moisture), the rate of proteolysis weakly varied regardless of the strain used. Fox and Walley (1971) observed that the proteolysis of β -caseins by other casein proteases as rennet and pepsin was influence by NaCl at concentrations above 2%. They explained that the inhibitory effect was mostly due to some alteration of the substrate rather than the enzyme as enzymes were still quite active on α_{s1} -caseins at NaCl levels where β -casein proteolysis was completely inhibited (10% NaCl). Moreover, other study on milk proteins like plasmin and chymosin explained also that NaCl influenced the caseins conformations and/or the protease activity (Lane and Fox, 1999). Indeed, NaCl should modify the β -casein rather than the enzyme but less marked influence of NaCl were shown on the proteolysis of α_{s1} -casein especially with chymosin. Finally, Fox and Walley (1971) explained that salt-induced aggregation or folding render β -caseins less accessible for proteolysis. In our work, the variations showed for α_{s1} -casein rate of degradation Figure 3 should be also mostly due to the modifications induced by NaCl on the proteinase. For example, the four PrtH from CNRZ32 (circles, Figure 3) seemed to be influenced by the high salt concentration (NaCl 3 = 4.5%) at both pH. For PrtH3 from ITGLH77, the high level of NaCl should influence more the β -casein conformation than the CEP by blocking the proteinase accessibility to the cleavage sites. However, PrtH3 seemed to require the presence of NaCl in the buffer to efficiently degrade the α_{s1} -casein but the absence of salt did not seem to impact β -casein hydrolysis at both pH.

These observations reinforce the hypothesis that NaCl influences the proteolytic activity of PrtH3 especially for α_{s1} -casein proteolysis. However, peptidic profiles observed on tris-tricine gels did not change regarding NaCl concentration neither for CNRZ32 or ITGLH77 nor for both caseins proteolysis.

The difference of activity between *L. helveticus* strains ITGLH77 (Prth3) and CNRZ32 (four proteinases) was mainly shown by the α_{s1} -casein degradation rate. Two hypotheses could explain this variation. First, as the two strains are non-isogenic, ITGLH77 could secrete peptidases like it had been proven with other *L. helveticus* strains (Blanc et al., 1993; Miyakawa et al., 1992) or other LAB as *S. thermophilus* (Hafeez et al., 2013) or *Lc. lactis* (Exterkate, 1984). Thus, as Christensen et al (Christensen et al., 2003) did not detect any extracellular peptidase activity for the strain CNRZ32, the difference of α_{s1} -casein proteolysis could be the result of an endopeptidase secreted on the cell-wall of ITGLH77. Second, the accessibility and quantity of Prth3 on the cell-wall of CNRZ32 strain can vary. Indeed, shaving results tended to show a better accession of trypsin on Prth3 than others CEPs. This could also imply a better accession of Prth3 to the substrate than the other CEPs displayed on the cell-wall.

Comparing both strains producing Prth3 (CNRZ32 and ITGLH77), it is possible that Prth3 quantity on the cell-wall of ITGLH77 strain would be higher than on CNRZ32 cell-wall. This could be due to the expression of the three other CEPs that would under-express *prth3* in CNRZ32 compared to ITGLH77 strain which have no competition with other CEP expression. Following this hypothesis, the lower quantity of active Prth3 on CNRZ32 cell-wall could explain the lower maximum degradation rate of α_{s1} -casein obtained for CNRZ32 (below 3%.min⁻¹), compared to the maximum degradation rate reached by ITGLH77 (closed to 6%.min⁻¹). The same could be applied for β -casein degradation rate as a higher quantity of active Prth3 on the cell-wall of *L. helveticus* strain ITGLH77 would overcome the influence of pH that had been observed with *L. helveticus* strain CNRZ32. Moreover, the decrease of Prth3 activity observed on α_{s1} -casein proteolysis in absence of salt was abolished with the proteolytic system containing four CEPs. Therefore, the loss of Prth3 activity in absence of salt could have been counteracted by the three other CEPs but at a lower rate.

Finally, for PrtS, only conditions at pH 5.2 and low NaCl concentrations (0 to 0.75%) allowed a degradation of β -casein close to 3%/min. The PrtS activity seemed lower than that of Prth3 but higher than all other CEPs of *L. helveticus*. Interestingly, although the salt concentration in Emmental cheese is usually close to 1.5% NaCl/moisture, proteolytic systems with PrtS tended to have a lower activity at this concentration *in vitro* even at pH 5.2. This difference in CEP activity could impact peptide production regarding to the strains used for cheese production in which salt concentration was divided by two.

4.3 In cheese

For validating differences in hydrolysing capabilities of CEPs in cheeses, the two highest proteolytic strains harbouring PrtH3 were chosen for Swiss-type cheese making under various NaCl concentrations: *L. helveticus* ITGLH77 and CNRZ32, co-cultured with the *S. thermophilus* strain ITGST88 that is highly proteolytic (Galia et al., 2009) and possesses the *prtS* gene 100% identical with *prtS* from strain LMD-9. Moreover, technical parameters tested to produce cheeses with similar compositions, as using the different times brining to reach the three NaCl levels, were successfully adapted.

4.3.1 Strains cultivability

The cultivability of starter strains used for cheeses manufacturing was especially strain-dependant (Table 4). This lysis difference between lactobacilli strains and its impact on the global proteolysis in cheeses was also observed in previous study (Gagnaire et al., 2001; Oommen et al., 2002; Sadat-Mekmene et al., 2013). The difference of two Log₁₀ observed after 48 days of ripening regarding the cultivability of lactobacilli strains in our study could also impact on the global proteolysis in cheese. Indeed, the metabolic activity of thermophilic lactic acid bacteria was detected in cheeses until the end of ripening by Falentin et al. (2012). Thus, differences in global proteolysis observed between lactobacilli strains could be due to differences of cell lysis as much by the release of intracellular peptidases and proteases as the metabolic activity remaining in intact cells. Moreover, *S. thermophilus* cell lysis started earlier in cheese in presence of *L. helveticus* strains compared to the control cheeses without *L. helveticus* strains as already shown by Valence et al (2000). This release of intracellular peptidases should also amplify the overall proteolysis in cheese complementing or even in synergy with *L. helveticus* peptidases.

Regarding NaCl impact on cultivability of strains, high NaCl level enhanced lactobacilli strains cultivability during warm room (24°C) ripening (from Day 20 to Day 48) but no effect has been observed on *S. thermophilus* strain cultivability in NoLH cheeses. It is also notable that the cultivability of the non-starter strain *P. freudenreichii* was eight times less cultivable at upper salt unlikely the lactobacilli strains as already shown (Boyaval et al., 1999). Finally, the low salt level did not impact the cultivability of any strains comparing to their regular salt level cultivability.

Finally, in cheeses an earlier decrease of cultivability was observed for *L. helveticus* CNRZ32 strains compared to *L. helveticus* ITGLH77 strain. These results corroborate *in vitro* observations where *L. helveticus* strain CNRZ32 was more prone to lysis when salt content increased above 1.5% in contrast to *L. helveticus* ITGLH77 strain that maintained cell integrity up to 4.5 % of NaCl during the 15 h of the proteolysis test (shown by the absence of release on intracellular enzyme on SDS PAGE gels). This is noticeable that strains having the four CEPs on the cell-wall, as it is also the case of *L. helveticus* ITGLH1 strain used in Sadat-Mekmene et al. (2013), have earlier lysis than others.

4.3.2 Cheese proteolysis

The global proteolysis of our cheeses can be compared to a previous study comparing proteolytic efficiency of ITGLH1 and ITGLH77 in Emmental cheese (Sadat-Mekmene et al., 2013). The global proteolysis, as shown by the NPN/TN ratio (Table 4), was compared between strains independently to NaCl levels, and ratios calculated between strains did not change from Day 1 to Day 48 of ripening. Thus, at Day 1, proteolysis was 1.6 times more extensive in cheese manufactured using CNRZ32 as starter than using ITGLH77 and 2.7 times more than NoLH cheeses. At Day 48, proteolysis in CNRZ32 cheeses was also 1.6 times more extensive than in ITGLH77 cheeses and 2.4 times more than in NoLH cheeses. These results of proteolysis in cheese were also observed by Sadat-Mekmene et al. (2013) which observed the proteolysis between cheeses manufactured with *L. helveticus* ITGLH1 or ITGLH77 strains. Indeed, no differences were observed comparing proteolysis parameters at regular NaCl level between cheeses manufactured with ITGLH1 (Sadat-Mekmene et al., 2013) and CNRZ32 (this study) at Day 1 and the last ripening day, as D41 for ITGLH1 cheese and D48 for CNRZ32. This high similarity of proteolysis results between cheeses manufactured with *L. helveticus* ITGLH1 and CNRZ32 strains at regular NaCl level highlights that ITGLH1 and CNRZ32 strains express a similar proteolytic phenotype during Emmental production. Moreover, as Broadbent et al. (2011), detected four CEP genes in *L. helveticus* ITGLH1 genome, like in CNRZ32 one's, the strain ITGLH1 would produce, as CNRZ32, its four CEPs during exponential growth in milk.

Regarding the casein proteolysis at Day 48, for all cheeses, β -caseins were more degraded than α_{s1} -caseins unlikely Marcos et al. (1979) observations on Emmental cheeses. No significant differences in β -casein proteolysis were observed in cheeses regardless of NaCl levels. However, α_{s1} -caseins proteolysis was lower in NoLH cheeses than in cheeses

manufactured with lactobacilli strains. This could be explained by the low cell lysis of streptococci and the lower specific activity observed during *in vitro* proteolysis. Globally, the highest affinity for β -caseins of all proteolytic strains was observed both *in vitro* and *in situ*. Regarding the salt effect on casein proteolysis, only α_{s1} -casein degradation was lower in N2 cheeses, which was also observed *in vitro* for high NaCl level with CNRZ32, but not with ITGLH77 for which α_{s1} -casein degradation rate did not appear to be affected by the high level of NaCl. So, differences of proteolysis observed between *in vitro* and *in situ* experiments at Day 48 should be highly explained by cell lysis and intracellular peptidase activity.

Regarding the evolution of NaCl level throughout ripening (from Day 8 to 48), the salt concentration in cheese at Day 8 was at least twice lower than concentrations observed at Day 48. Moreover, even if the difference in salt concentration between the regular (N1) and the low (N0.5) was significantly different along ripening, at Day 8, the salt concentration in N0.5 cheeses (0.25 g NaCl/100 g of cheese) were not yet twice lower than in N1 cheeses (0.32 g NaCl/100 g of cheese). This could correspond to the slow diffusion of salt in the cheese after brining up to the heart of the wheel. Thus, the salt diffusion in cheeses along the ripening could explain the gradual differentiation between N2 cheeses and others N1 and N0.5 levels observed in Figure 6, with a higher salt effect at the end of ripening when NaCl diffusion was stabilised.

4.3.3 Activity of CEPs in cheese

The CEPs activity was observed only at Day 1 in cheese, as the low cell lysis in cheeses noticed at Day 8 could introduce intracellular peptidases activity. Regarding the β -casein/ α_{s1} -casein ratio, β -casein was more degraded than α_{s1} -casein for all cheeses manufactured. These results confirmed both cheese results for *L. helveticus* ITGHL1 and ITGLH77 (Sadat-Mekmene et al., 2013) and the trend observed in our *in vitro* results as lactobacilli and streptococci proteolytic system presented a higher affinity for β -casein than α_{s1} -casein. Thus, the *L. helveticus* strain ITGLH77 and *S. thermophilus* ST88 were slightly more proteolytic than strain CNRZ32 regarding α_{s1} - and β -casein degradation (Table 4). It should be noted that ITGLH77 cheeses presented a higher amount of lactobacilli CFU count (0.5 Log₁₀) compared to CNRZ32 cheeses. This difference of proteolytic activity was observed during *in vitro* proteolysis for ITGLH77 but the streptococci proteolytic activity was higher in cheese than observed during *in vitro* experiments as *S. thermophilus* strain LMD-9 activity appeared lower than both *L. helveticus* strains. This unexpected difference could be explained by a

variation of PrtS quantity at the cell surface between streptococci strains. Concerning the proteolytic profile of lactobacilli strains ITGLH77 and CNRZ32 at Day 1 (Figure 7), their quite similarity suggests, as under *in vitro* conditions, a higher activity of their common CEP, PrtH3, with a slightly higher activity of ITGLH77. However, regarding the higher amount of proteolytic products (SN/TN and NPN/TN) in CNRZ32 cheeses, the three other CEPs (PrtH, PrtH2 and PrtH4) could go into action by proteolysing the degradation products of PrtH3.

Finally, we showed that Emmental production with low NaCl level is technically possible without modifying cheeses parameters since lactobacilli strain cultivability and proteolytic activity were not inhibited by low salt level, as observed in CNRZ32 and ITGLH77 cheeses. However, as no sensorial tests have been performed, the low level of salt could bring bitterness as explained by Sousa et al (2001). Indeed, salt may decrease bitterness by inhibiting CEPs and thereby promote the aggregation of large non-bitter, hydrophobic regions of the caseins (e.g., the C-terminal region of β -casein) and perhaps peptides which would otherwise be degraded to bitter peptides.

5 Conclusion

In our experimental conditions, Proteolytic systems harbouring PrtH3, the ubiquitous CEP in *L. helveticus*, showed the highest proteolytic activity compared to those harbouring PrtH4 or PrtS. Moreover, the unique expression of PrtH3 in *L. helveticus* strain ITGLH77 on the cell-wall seemed to confer a higher proteolytic activity compared to the simultaneously expression of four CEPs (PrtH, PrtH2, PrtH3 and PrtH4) in *L. helveticus* strain CNRZ32.

In vitro proteolysis of purified α_{s1} - and β -caseins seemed to be enhanced at pH 5.2, the Emmental pH, compared to pH 7.5 previously used for *in vitro* characterisations of *L. helveticus* CEPs. Also, the *L. helveticus* ITGLH77 strain, expressing PrtH3, degraded the α_{s1} -casein at a higher level than CNRZ32 which produced the four proteinases. Activities of proteolytic systems were differently influenced by NaCl level under *in vitro* conditions. Indeed, at pH 5.2, lactobacilli proteolytic systems were only influenced by extreme NaCl levels (0 and 4.5% NaCl).

In cheese, data analyses at Day 1 mostly confirmed the *in vitro* analyses with a higher proteolysis of β -casein than α_{s1} -casein and a *L. helveticus* strain-dependant impact on proteolysis characteristics as also observed by Sadat-Mekmene et al (Sadat-Mekmene et al., 2013). Regarding the global proteolysis in cheeses, the high salt concentration (3%) clearly

impacted the cheese final characteristics after 20 and 48 days of ripening with lower proteolytic indices and higher textural values whereas lower NaCl levels (0.75 to 1.5%) did not change cheese characteristics as starter cultivability, proteolytic indices or textural parameters.

These results lead to the hypothesis that PrtH, PrtH2 and/or PrtH4 would have a low proteolytic activity that would be modulated differentially regarding the environment as pH or NaCl. Moreover, these three CEPs appeared to be more active on casein fragments than on entire caseins that would be explained by the higher production of small peptides in cheeses conditions. The successful technics used to manufacture low-salt Emmental cheeses open gates to further studies to estimate the low-salt impact on Emmental taste like its flavour or possible bitterness.

Acknowledgments: The research leading to these results has received funding from the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement n°289397 (TeRiFiQ project). *L. helveticus* strains CNRZ32 CIRM-BIA 103, CNRZ328 CIRM-BIA 110 and ITGLH77 CIRM-BIA 99 was kindly provided by the Centre International de Ressources Microbiennes-Bactéries d'Intérêt Alimentaire, INRA, Rennes, France. *L. helveticus* R0052 was kindly provided by Dr Thomas Tompkins from the Rosell institute, Montreal, QC, Canada, H4P 2R2. *L. helveticus* UPR14 was kindly provided by Pr Monica Gatti from the Department of Genetics, Biology of Microorganisms, Anthropology, Evolution, University of Parma, Viale Usberti 11/A, 43100 Parma, Italy. Xavier LECOMTE is the recipient of a Ph.D. fellowship from the « Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche ».

6 References

- Ardö, Y., and H.-E. Pettersson. 1988. Accelerated cheese ripening with heat treated cells of *Lactobacillus helveticus* and a commercial proteolytic enzyme. *J. Dairy Res.* 55:239–245. doi:10.1017/S0022029900026066.
- Bartels, H.J., M.E. Johnson, and N.F. Olson. 1987a. Accelerated ripening of Gouda cheese. 1. Effect of heat-shocked thermophilic lactobacilli and streptococci on proteolysis and flavor development. *Milchwissenschaft.* 42:83–88.
- Bartels, H.J., M.E. Johnson, and N.F. Olson. 1987b. Accelerated ripening of Gouda cheese. 2. Effect of freeze-shocked *Lactobacillus helveticus* on proteolysis and flavor development. *Milchwissenschaft.* 42:139–144.
- Boyaval, P., C. Deborde, C. Corre, C. Blanco, and É. Bégué. 1999. Stress and osmoprotection in propionibacteria. *Le Lait.* 79:59–69. doi:10.1051/lait:199914.
- Broadbent, J.R., H. Cai, R.L. Larsen, J.E. Hughes, D.L. Welker, V.G. De Carvalho, T.A. Tompkins, Y. Ardö, F. Vogensen, A. De Lorentiis, M. Gatti, E. Neviani, and J.L. Steele. 2011. Genetic diversity in proteolytic enzymes and amino acid metabolism among *Lactobacillus helveticus* strains. *J. Dairy Sci.* 94:4313–4328.
- Broadbent, J.R., J.E. Hughes, D.L. Welker, T.A. Tompkins, and J.L. Steele. 2013. Complete Genome Sequence for *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32, an Industrial Cheese Starter and Cheese Flavor Adjunct. *Genome Announc.* 1:e00590–13. doi:10.1128/genomeA.00590-13.
- Cachat, E., and F.G. Priest. 2005. *Lactobacillus suntoryeus* sp nov., isolated from malt whisky distilleries. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:31–34. doi:10.1099/ijs.0.63266-0.
- Camacho, C., G. Coulouris, V. Avagyan, N. Ma, J. Papadopoulos, K. Bealer, and T.L. Madden. 2009. BLAST plus : architecture and applications. *BMC Bioinformatics.* 10:421. doi:10.1186/1471-2105-10-421.
- Christensen, J.E., J.R. Broadbent, and J.L. Steele. 2003. Hydrolysis of Casein-Derived Peptides S1-Casein(f1-9) and -Casein(f193-209) by *Lactobacillus helveticus* Peptidase Deletion Mutants Indicates the Presence of a Previously Undetected Endopeptidase. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1283–1286. doi:10.1128/AEM.69.2.1283-1286.2003.
- Collin, J.C., J.L. Berdagué, M. DOGNIN-BERGERET, R. Grappin, M.-P. Muttoni, and O. Rolet-Repecaud. 1987. Affinage et qualité du Gruyère de Comté. IV. Etude de la protéolyse. *Lait - Dairy Sci. Technol.* 67:299–317.
- Corrieu, G., H.E. Spinnler, D. Picque, and Y. Jomier. 1988. Automated system to follow up and control the acidification activity of lactic acid starters.
- Dandoy, D., C. Fremaux, M.H. De Frahan, P. Horvath, P. Boyaval, P. Hols, and L. Fontaine. 2011. The fast milk acidifying phenotype of *Streptococcus thermophilus* can be acquired by natural transformation of the genomic island encoding the cell-envelope proteinase PrtS. *Microb. Cell Factories.* 10.
- Drake, M.A., T.D. Boylston, K.D. Spence, and B.G. Swanson. 1996. Chemical and sensory effects of a *Lactobacillus* adjunct in Cheddar cheese. *Food Res. Int.* 29:381–387. doi:10.1016/0963-9969(96)00006-3.

- Exterkate, F.A. 1984. Location of Peptidases Outside and Inside the Membrane of *Streptococcus cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:177–183.
- Exterkate, F.A., and A.C. Alting. 1993. The conversion of the α -s1-Casein-(1-23)-fragment by the free and bound form of the cell-envelope proteinase of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* under conditions prevailing in cheese. *Syst. Appl. Microbiol.* 16:1–8.
- Exterkate, F.A., A.C. Alting, and C.J. Slangen. 1995. Conversion of α s1-Casein-(24-199)-Fragment and β -Casein under Cheese Conditions by Chymosin and Starter Peptidases. *Syst. Appl. Microbiol.* 18:7–12. doi:10.1016/S0723-2020(11)80442-X.
- Exterkate, F.A., C. Slangen, and R.J. Siezen. 2001. Effect of genetically modified *Lactococcus lactis* cell-envelope proteinases with altered specificity on the course of casein degradation under cheese conditions. *Cheese Ripening Technol.* 11:363–371. doi:10.1016/S0958-6946(01)00065-6.
- Falentin, H., N. Henaff, P. Le Bivic, S.-M. Deutsch, S. Parayre, R. Richoux, D. Sohier, A. Thierry, S. Lortal, and F. Postollec. 2012. Reverse transcription quantitative PCR revealed persistency of thermophilic lactic acid bacteria metabolic activity until the end of the ripening of Emmental cheese. *Food Microbiol.* 29:132–140. doi:10.1016/j.fm.2011.09.009.
- Fox, P.F., and B.F. Walley. 1971. Influence of sodium chloride on the proteolysis of casein by rennet and by pepsin. *J. Dairy Res.* 38:165–170. doi:10.1017/S0022029900019282.
- Fröhlich-Wyder, M.T., and H.P. Bachmann. 2004. Cheeses with propionic acid fermentation. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. P.L.H.M., Timothy M. Cogan and Timothy P. Guinee Patrick F. Fox, editor. Academic Press. 141–XV.
- Gagnaire, V., D. Molle, M. Herrouin, and J. Leonil. 2001. Peptides identified during emmental cheese ripening: Origin and proteolytic systems involved. *J. Agric. Food Chem.* 49:4402–4413.
- Galia, W., C. Perrin, M. Genay, and A. Dary. 2009. Variability and molecular typing of *Streptococcus thermophilus* strains displaying different proteolytic and acidifying properties. *Int. Dairy J.* 19:89–95. doi:10.1016/j.idairyj.2008.08.004.
- Genay, M., L. Sadat, V. Gagnaire, and S. Lortal. 2009. *prhH2*, not *prhH*, is the ubiquitous cell-wall proteinase gene in *Lactobacillus helveticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:3238–3249.
- Green, M.R., and J. Sambrook. 2012. Molecular cloning: a laboratory manual. 4th Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y.
- Gripon, J.C., M.J. Desmazeaud, D. Le Bars, and J.L. Bergere. 1975. Etude du rôle des micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. II. - Influence de la présure commerciale. *Le Lait*. 55:502–516. doi:10.1051/lait:197554828.
- Hafeez, Z., C. Cakir-Kiefer, J.-M. Girardet, J. Jardin, C. Perrin, A. Dary, and L. Miclo. 2013. Hydrolysis of milk-derived bioactive peptides by cell-associated extracellular peptidases of *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97:9787–9799. doi:10.1007/s00253-013-5245-7.
- Heiss, E. 1961. Studies of rapid methods for the determination of fat content of cheese. *Dtsch. Molk.-Ztg.* 82:67–70.

- Ishihama, Y., Y. Oda, T. Tabata, T. Sato, T. Nagasu, J. Rappsilber, and M. Mann. 2005. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol. Cell. Proteomics*. 4:1265–1272.
- Korhonen, H. 2009. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *J. Funct. Foods*. 1:177–187. doi:10.1016/j.jff.2009.01.007.
- Kruchroo, C.N., and P.F. Fox. 1982. SOLUBLE NITROGEN IN CHEDDAR CHEESE - COMPARISON OF EXTRACTION PROCEDURES. *Milchwiss.-MILK Sci. Int.*. 37:331–335.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680–685.
- Lane, C.N., and P.F. Fox. 1999. The individual or combined action of chymosin and plasmin on sodium caseinate or β -casein in solution: effect of NaCl and pH. *Le Lait*. 79:423–434. doi:10.1051/lait:1999435.
- Lecomte, X., V. Gagnaire, V. Briard-Bion, J. Jardin, S. Lortal, A. Dary, and M. Genay. 2014. The naturally competent strain *Streptococcus thermophilus* LMD-9 as a new tool to anchor heterologous proteins on the cell surface. *Microb. Cell Factories*. 13:82. doi:10.1186/1475-2859-13-82.
- Lemieux, L., and R. Simard. 1992. Bitter flavour in dairy products. II. A review of bitter peptides from caseins: their formation, isolation and identification, structure masking and inhibition. *Lait*. 72:335–382.
- Makarova, K., A. Slesarev, Y. Wolf, A. Sorokin, B. Mirkin, E. Koonin, A. Pavlov, N. Pavlova, V. Karamychev, N. Polouchine, V. Shakhova, I. Grigoriev, Y. Lou, D. Rohksar, S. Lucas, K. Huang, D.M. Goodstein, T. Hawkins, V. Plengvidhya, D. Welker, J. Hughes, Y. Goh, A. Benson, K. Baldwin, J.H. Lee, I. Diaz-Muniz, B. Dosti, V. Smeianov, W. Wechter, R. Barabote, G. Lorca, E. Altermann, R. Barrangou, B. Ganesan, Y. Xie, H. Rawsthorne, D. Tamir, C. Parker, F. Breidt, J. Broadbent, R. Hutkins, D. O’Sullivan, J. Steele, G. Unlu, M. Saier, T. Klaenhammer, P. Richardson, S. Kozyavkin, B. Weimer, and D. Mills. 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*. 103:15611–15616.
- Marcos, A., M.A. Esteban, F. León, and J. Fernández-Salguero. 1979. Electrophoretic Patterns of European Cheeses: Comparison and Quantitation. *J. Dairy Sci.*. 62:892–900. doi:10.3168/jds.S0022-0302(79)83345-7.
- Miclo, L., E. Roux, M. Genay, E. Brusseau, C. Poirson, N. Jameh, C. Perrin, and A. Dary. 2012. Variability of hydrolysis of β -, α s1-, and α s2 caseins by 10 strains of *Streptococcus thermophilus* and resulting bioactive peptides. *J. Agric. Food Chem.*. 60:554–565. doi:10.1021/jf202176d.
- Mulvihill, D.M., and P.F. Fox. 1978. Proteolysis of Bovine β -Casein by Chymosin: Influence of pH, Urea and Sodium Chloride. *Ir. J. Food Sci. Technol.*. 2:135–139. doi:10.2307/25557963.
- Olaya-Abril, A., L. Gomez-Gascon, I. Jimenez-Munguia, I. Obando, and M.J. Rodriguez-Ortega. 2012. Another turn of the screw in shaving Gram-positive bacteria: optimization of

- proteomics surface protein identification in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Proteomics*. 75:3733–3746.
- Olaya-Abril, A., I. Jiménez-Munguía, L. Gómez-Gascón, and M.J. Rodríguez-Ortega. 2014. Surfomics: Shaving live organisms for a fast proteomic identification of surface proteins. *J. Proteomics*. 97:164–176. doi:10.1016/j.jprot.2013.03.035.
- Oommen, B.S., D.J. McMahon, C.J. Oberg, J.R. Broadbent, and M. Strickland. 2002. Proteolytic specificity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* influences functional properties of mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.* 85:2750–2758. doi:10.3168/jds.S0022-0302(02)74362-2.
- Pearce, K.N. 1977. The complexometric determination of calcium in dairy products. *N Z J Dairy Sci Technol*. 12:113.
- Pederson, J.A., G.J. Mileski, B.C. Weimer, and J.L. Steele. 1999. Genetic characterization of a cell envelope-associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *J. Bacteriol.* 181:4592–4597.
- Rappsilber, J., U. Ryder, A.I. Lamond, and M. Mann. 2002. Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Res.* 12:1231–1245.
- R Core Team. 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Richoux, R., G. Roset, M.H. Famelart, and J.R. Kerjean. 2001. Diversity of some functional characteristics of melted French Emmental-cheese. *Lait*. 81:547–559.
- Sadat-Mekmene, L., M. Genay, D. Atlan, S. Lortal, and V. Gagnaire. 2011a. Original features of cell-envelope proteinases of *Lactobacillus helveticus*. A review. *Int. J. Food Microbiol.* 146:1–13. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.039.
- Sadat-Mekmene, L., J. Jardin, C. Corre, D. Molle, R. Richoux, M.M. Delage, S. Lortal, and V. Gagnaire. 2011b. Simultaneous presence of PrtH and PrtH2 proteinases in *Lactobacillus helveticus* strains improves breakdown of the pure alpha(s1)-casein. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:179–186.
- Sadat-Mekmene, L., R. Richoux, L. Aubert-Frogerais, M.-N. Madec, C. Corre, M. Piot, J. Jardin, S. le Feunteun, S. Lortal, and V. Gagnaire. 2013. *Lactobacillus helveticus* as a tool to change proteolysis and functionality in Swiss-type cheeses. *J. Dairy Sci.* 96:1455–1470. doi:10.3168/jds.2012-6179.
- Schägger, H., and G. von Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166:368–379.
- Schneewind, O., and D.M. Missiakas. 2012. Protein secretion and surface display in Gram-positive bacteria. *Philos. Trans. R. Soc. B-Biol. Sci.* 367:1123–1139.
- Soeryapranata, E., J.R. Powers, and G. Unlu. 2007. Cloning and characterization of debittering peptidases, PepE, PepO, PepO2, PepO3, and PepN, of *Lactobacillus helveticus* WSU19. *Int. Dairy J.* 17:1096–1106. doi:10.1016/j.idairyj.2007.02.002.

Solis, N., M.R. Larsen, and S.J. Cordwell. 2010. Improved accuracy of cell surface shaving proteomics in *Staphylococcus aureus* using a false-positive control. *Proteomics*. 10:2037–2049.

Sousa, M.J., Y. Ardö, and P.L.H. McSweeney. 2001. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *Int. Dairy J.* 11:327–345. doi:10.1016/S0958-6946(01)00062-0.

Terzaghi, B.E., and W.E. Sandine. 1975. Improved medium for lactic Streptococci and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.* 29:807–813.

Thierry, A., D. Salvat-Brunaud, M.N. Madec, F. Michel, and J.L. Maubois. 1998. Swiss cheese ripening: dynamics of bacterial populations and evolution of the aqueous phase composition for three industrial cheeses. *Lait*. 78:521–542.

Tompkins, T.A., G. Barreau, and J.R. Broadbent. 2012. Complete genome sequence of *Lactobacillus helveticus* R0052, a commercial probiotic strain. *J. Bacteriol.* 194:6349–6349. doi:10.1128/JB.01638-12.

Valence, F., S.M. Deutsch, R. Richoux, V. Gagnaire, and S. Lortal. 2000. Autolysis and related proteolysis in Swiss cheese for two *Lactobacillus helveticus* strains. *J. Dairy Res.* 67:261–271. doi:10.1017/S0022029900004118.

7 Supplemental data

Supplemental data 1: Proteins identified after cell surface shaving of *L. helveticus* strains CNRZ32 CIRM-BIA 103 (CNRZ32) and ITGLH77 CIRM-BIA 99 (LH77).

Strain	Prot Id	Description	MW	Peptides	emPAI	Location	Clues to predict location
CNRZ32	U6FFS9	LHCIRMBIA103_02073 Lactocepin H3 proteinase	178.70	23	2.525	CS	Signal peptide
CNRZ32	U6FJC5	LHCIRMBIA103_02165 Lactocepin H4 proteinase	174.90	5	0.328	CS	Signal peptide
CNRZ32	C5J2C0	Tuf (Fragment)	29.50	11	10.659	CS and Cyto	Henderson and Martin, 2011
CNRZ32	A8YUV4	Enolase	46.60	11	3.642	CS and Cyto	Henderson and Martin, 2011
CNRZ32	A8YV23	Pyruvate kinase	63.00	8	1.219	CS and Cyto	Henderson and Martin, 2011
CNRZ32	A8YWA2	Putative uncharacterized protein	35.80	6	2.455	CS	Signal peptide
CNRZ32	A4ZGV7	Fructose-1,6-biphosphate aldolase	33.30	5	2.981	CS and Cyto	Henderson and Martin, 2011
CNRZ32	C2EQS6	L-lactate dehydrogenase	35.10	5	1.610	Cyto	predicted
CNRZ32	O32765	L-lactate dehydrogenase	35.00	5	1.848	Cyto	predicted
CNRZ32	U6FHP9	LHCIRMBIA103_00764 Cell-envelope associated proteinase H2	192.30	5	0.197	CS	Signal peptide
CNRZ32	C9M4T8	Putative uncharacterized protein (Fragment)	69.50	5	1.254	CS	Signal peptide
CNRZ32	A4ZGY6	60 kDa chaperonin (groL)	57.50	4	0.532	CS and Cyto	Henderson and Martin, 2011
CNRZ32	U6FGX9	LHCIRMBIA103_00753 Cell envelope-associated proteinase H	207.50	4	0.187	CS	Signal peptide
CNRZ32	A8YUS3	Trigger factor (tig)	50.40	4	1.154	CS and Cyto	Henderson and Martin, 2011
CNRZ32	A8YXK3	Elongation factor G	76.70	4	0.311	Cyto	predicted
CNRZ32	A8YWB1	Penicillin-binding protein	73.90	4	0.417	CS	predicted
CNRZ32	A4ZH15	Phosphoribosylformylglycinamide synthase 2 (purL)	81.70	3	0.509	Cyto	Swiss prot
CNRZ32	A8YVQ3	Chaperone protein DnaK	65.60	2	0.280	CS and Cyto	Henderson and Martin, 2011
CNRZ32	A8YXM2	30S ribosomal protein S5 (rpsE)	17.90	2	1.683	Cyto	predicted
CNRZ32	A8YXL9	30S ribosomal protein S8 (rpsH)	14.50	2	2.162	Cyto	predicted
CNRZ32	C9M3P2	PTS family porter, phosphocarrier protein HPR (ptsH)	9.30	3	4.623	CS	predicted
CNRZ32	A8YTF2	50S ribosomal protein L7/L12 (rplL)	12.40	3	2.981	Cyto	predicted
CNRZ32	A8YWA1	UDP-galactose 4-epimerase	36.30	3	0.931	Cyto	predicted
CNRZ32	A8YUE3	Phosphoglycerate kinase (pgk)	42.70	3	0.551	Cyto	predicted
CNRZ32	A8YX23	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase (gpmA)	26.50	3	1.848	Cyto	predicted
CNRZ32	C9LZC9	Oligopeptide ABC superfamily (oppA4)	65.20	3	0.468	CS	predicted
CNRZ32	A8YW88	Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase (purC)	27.30	2	0.389	Cyto	predicted

CNRZ32	A8YUE4	Triosephosphate isomerase	27.50	2	0.425	Cyto	predicted
Strain	Prot Id	Description	MW	Peptides	emPAI	Location	Clues to predict location
CNRZ32	A8YXM0	50S ribosomal protein L6	19.10	2	0.778	Cyto	predicted
CNRZ32	A8YVR9	30S ribosomal protein S2 (rpsB)	28.70	2	0.359	Cyto	predicted
CNRZ32	A8YVR8	Elongation factor Ts	37.60	2	0.468	Cyto	predicted
CNRZ32	A8YW55	Putative alkylphosphonate ABC transporter	34.10	2	0.425	CS	predicted
CNRZ32	C9M349	Xylulose-5-phosphate phosphoketolase (xpkA)	91.20	2	0.125	Cyto	predicted
CNRZ32	A8YV36	DNA-binding protein II HB	9.70	2	2.162	Cyto	predicted
CNRZ32	A8YTF1	50S ribosomal protein L10 (rplJ)	18.60	2	1.512	Cyto	predicted
CNRZ32	A4ZH30	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit(clpE2)	79.20	2	0.136	Cyto	predicted
CNRZ32	A8YV34	30S ribosomal protein S1	44.20	2	0.701	Cyto	predicted
ITTTGLH77		Prth3 ITGLH77 CIRM-BIA 99	177.30	20	1.894	CS	Signal peptide
LH77	A8YW31	Putative uncharacterized protein	68.30	5	0.616	CS	Signal peptide
LH77	A8YWA2	Putative uncharacterized protein	35.80	3	1.031	CS	Signal peptide
LH77	A8YUS2	Elongation factor Tu (tuf)	43.40	4	0.624	CS and Cyto	Henderson and Martin, 2011
LH77	A8YUE0	Putative uncharacterized protein	61.00	3	0.334	CS	Signal peptide
LH77	C9LZC9	Oligopeptide ABC superfamily	65.20	3	0.334	CS	predicted
LH77	P38059	S-layer protein (slpH)	46.60	3	0.413	CS	predicted
LH77	A8YXB3	Putative uncharacterized protein	36.60	3	0.540	CS	Signal peptide
LH77	A8YW55	Putative alkylphosphonate ABC transporter	34.10	3	0.701	CS	predicted
LH77	A8YV23	Pyruvate kinase	63.00	3	0.425	CS and Cyto	Henderson and Martin, 2011
LH77	A7GMI4	reversed SCP-like extracellular (Bcer98)	31.40	2	0.520	CS	predicted
LH77	A4ZGZ4	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	46.60	2	0.212	CS	predicted
LH77	A8YXK4	30S ribosomal protein S10 (rpsJ)	11.40	2	1.154	Cyto	predicted

emPAI: exponentially modified Protein Abundance Index (Ishihama)

Peptides: number of identified peptides belonging to identified protein

Prot Id: Identification sequence from the following databases TrEMBL or Swiss prot (in italic)

MW: molecular weight in kDa

Locations of proteins were predicted either by Uniprot data bank or by similarity to subcellular located proteins (Camacho et al., 2009).

Two locations are proposed: cell surface (CS) and cytoplasm (Cyto).

III Analyses *in silico* des domaines des protéases de paroi de *L. helveticus* et focus sur PrtH3

Les résultats d'hydrolyse des caséines par les différentes protéases de paroi de *L. helveticus*, qu'elles soient présentes ensemble sur la paroi comme c'est le cas chez *L. helveticus* CNRZ32 CIRM-BIA 103 ou individuellement comme chez les souches ITGLH77, R0052, LH146, R0413, suggèrent que PrtH3 serait la seule protéase réellement active sur les caséines α_{s1} ou β . De plus, les résultats semi-quantitatifs du shaving ont suggéré que PrtH3 serait soit plus abondante que les trois autres protéases pariétales sur la paroi de CNRZ32 soit plus accessible à la trypsine, ce qui aboutirait à une meilleure accessibilité de PrtH3 au substrat. La singularité de PrtH3 pourrait s'expliquer d'une part, par diverses régulations post-traductionnelles dépendantes de sa séquence signal ou bien de sa maturation une fois la protéase sécrétée et positionnée sur la paroi. D'autre part, la disposition des protéases au niveau de la paroi pourrait jouer sur leur accessibilité au substrat et cela serait en grande partie dépendant des domaines situés en C-terminal qui interagiraient avec le peptidoglycane. L'ensemble de ces hypothèses nous a amené à étudier *in silico* les domaines et les structures secondaires des quatre protéases de paroi de *L. helveticus* afin d'établir les points de similarité et de divergence entre ces protéases et d'autres protéases pariétales retrouvées chez les bactéries lactiques.

III.A Domaines et structures secondaires des protéases de paroi de *L. helveticus*.

Les protéases de paroi des bactéries lactiques ont surtout été étudiées chez *Lc. lactis* avec PrtP (Vos et al., 1989) mais également chez *L. helveticus* avec ses quatre PrtH (Broadbent et al., 2011 ; Genay et al., 2009 ; Pederson et al., 1999), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* avec PrtB (Gilbert et al., 1996), *L. rhamnosus* avec PrtR (Pastar et al., 2003) et *S. thermophilus* avec PrtS (Fernandez-Espla et al., 2000). L'attribution des différents domaines des CEP et leur nomenclature ont été définis par Siezen (1999) à partir d'alignements multiples et de la recherche des homologies entre les séquences des protéases de paroi PrtP, PrtH et PrtB ainsi que les protéases de paroi ScpA et Csp de *S. pyogenes* et *S. agalactiae* respectivement. Ces domaines ont été décrits et présentés dans l'introduction de ce manuscrit.

Récemment, Broadbent et al. (2011) ont révélé l'existence dans le génome de *L. helveticus* CNRZ32 de deux gènes supplémentaires codant des protéases. Il s'agit des gènes *prtH3* et *prtH4*. Les protéases PrtH3 et PrtH2 sont issues de gènes paralogues et présentent 62% d'identité. PrtH4 partage 53 et 54% d'identité avec PrtH2 et PrtH3, respectivement (Introduction, Tableau 4 p. 39). Les domaines des deux protéases de paroi récemment identifiées, PrtH3 et PrtH4, n'ont pas encore été définis contrairement à PrtH et PrtH2 (Pederson et al., 1999 ; Genay et al., 2009). Nous avons donc comparé les séquences des domaines précédemment établis en réalisant des alignements multiples puis défini les limites des différents domaines de PrtH3 et PrtH4. Les domaines S, PP, PR et A présents du côté N-terminal des protéines possèdent des séquences suffisamment proches pour être déterminés par homologie de séquence avec les autres domaines des protéases de paroi des bactéries lactiques. Cependant, il a été plus difficile de délimiter les domaines B, H et W, du fait de leur plus faible homologie de séquence. Plutôt que de comparer uniquement les séquences des protéases de paroi, nous avons considéré dans notre étude leur caractère hydrophobe en utilisant le logiciel « Hydrophobic Cluster Analysis » (HCA) (Figure 8) qui construit une « carte » des régions (ou *cluster*) à partir des résidus d'acides aminés hydrophobes et en tenant compte de la structure secondaire de la protéine (Woodcock et al., 1992 ; Callebaut et al., 1997a, 1997b). Les protéases PrtS, PrtH et PrtH2, dont les domaines protéiques ont été délimités sur la base de la comparaison de séquences (Fernandez-Espla et al., 2000 ; Genay et al., 2009 ; Pederson et al., 1999), ont été utilisées comme modèles afin de retrouver des structures spécifiques de chaque domaine. Les « clusters » ainsi mis en évidence ont aussi été associés à des structures secondaires prédites par des algorithmes de prédiction de structures secondaires tels que GOR IV (Garnier et al., 1996) et CFSSP (Chou et Fasman, 1974a, 1974b).

Afin de tester notre méthode, les séquences protéiques des protéases PrtS, PrtH et PrtH2 ont été analysées avec le logiciel HCA (<http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#forms::rpbs.HCA>) et les domaines déjà définis ont été reportés sur la séquence (Figure 9 A, B et C). Les structures secondaires prédites par les logiciels CFSSP et GOR IV étant proches, seules les structures secondaires prédites par GOR IV ont été reportées sur les séquences des protéases de paroi dans la partie C-terminale à partir de la fin du domaine B.

human $\alpha 1$ antitrypsin

1D

246 ...GNATAIFFFLPDEGKQHENE $\square$ THD $\square$ ITKFL $\square$ ENEDRRS... 283
 ...♦NA $\square$ AIFFFL★DEGKQHENE $\square$ HD $\square$ ITKFL $\square$ ENEDRR $\square$...
 ...00000111100000100100010001100110000000...

2D

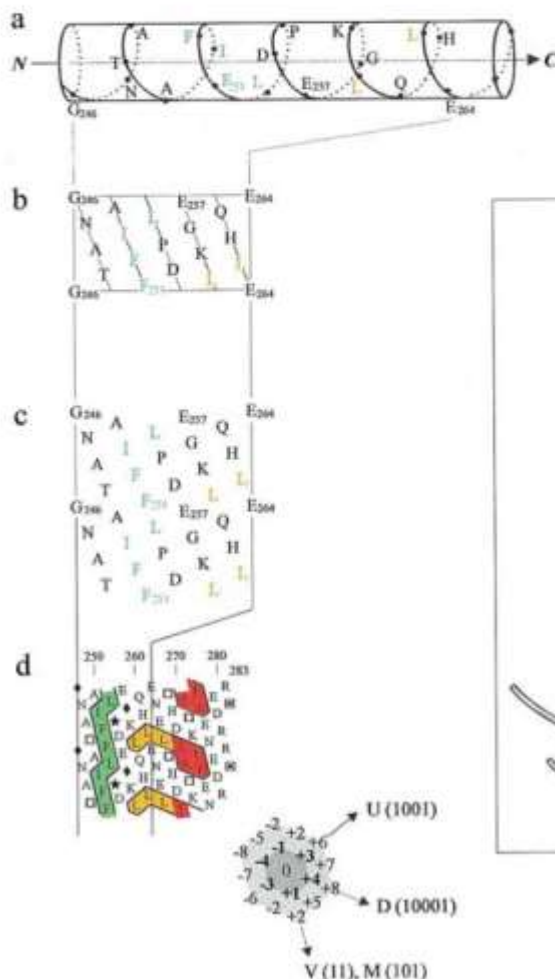
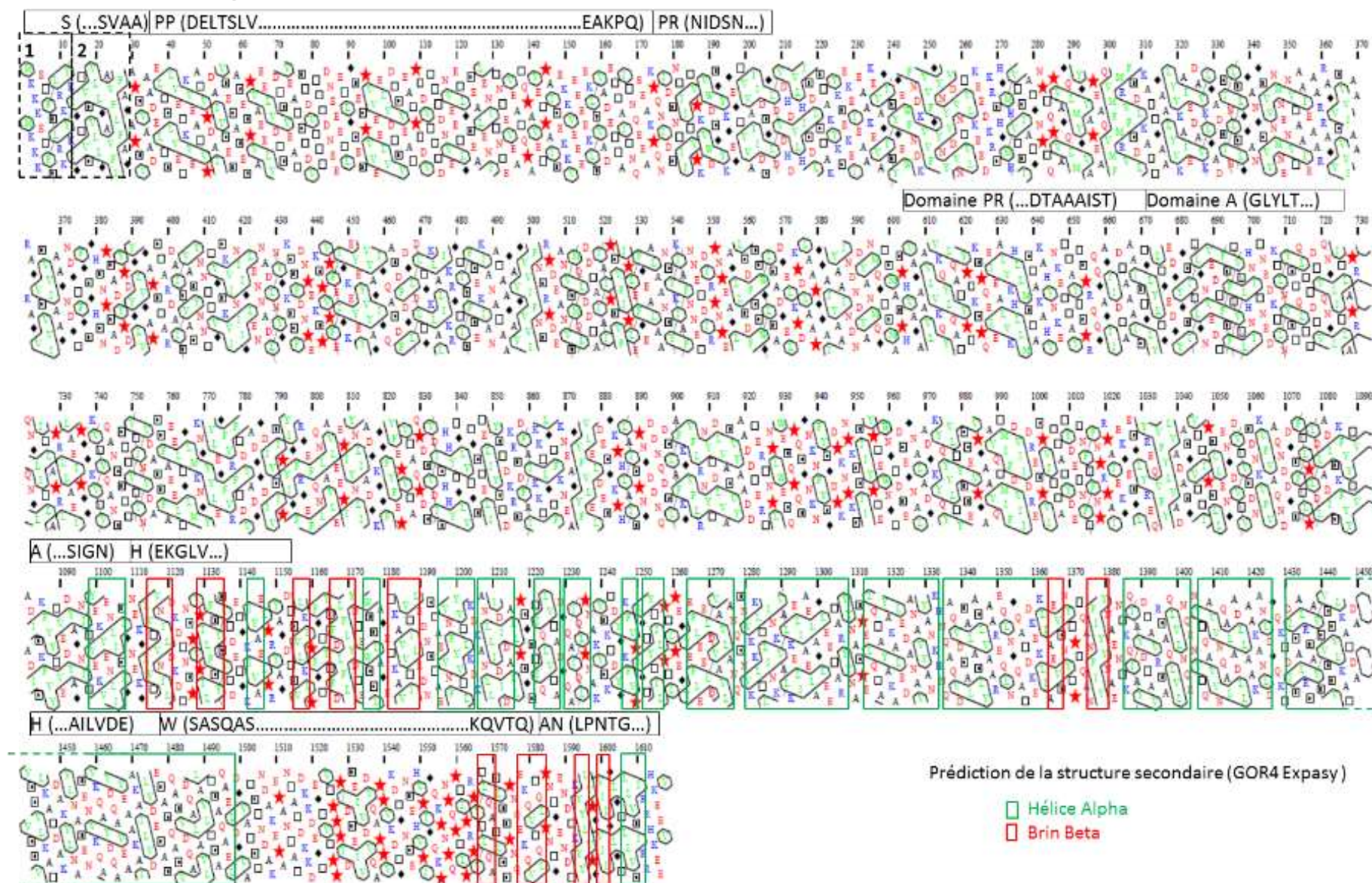
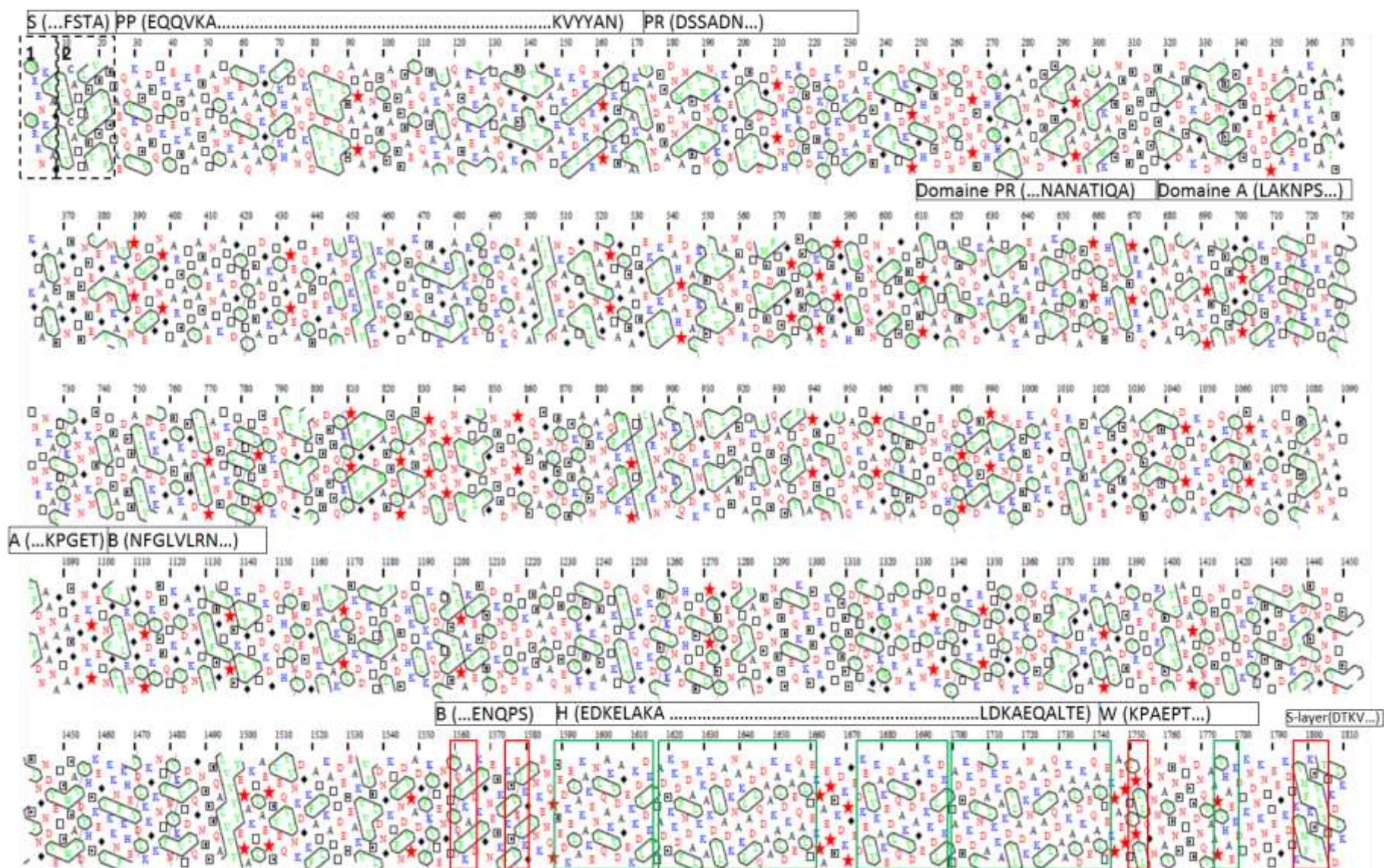


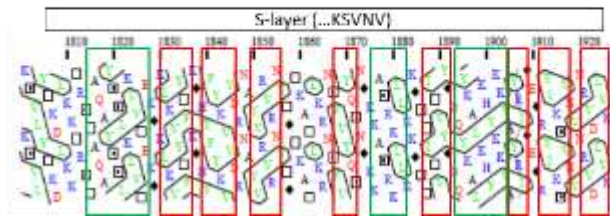
Figure 8 : Illustration des résultats obtenus par le logiciel Hydrophobic cluster analysis (HCA). La séquence étudiée (1D) est reportée sur la projection plane d'une hélice α (3,6 résidu/tour) (2D a et b). Cette projection est ensuite dédoublée de façon à éviter des "effets de bord" et de mieux apprécier l'importance et la nature des amas hydrophobes (2D c et d). Certains résidus d'acides aminés pouvant jouer un rôle important dans la structure secondaire des protéines sont représentés par des symboles. Une étoile (★) représente un résidu de proline qui confère une conformation très spécifique à la chaîne polypeptidique. Un losange (♦) représente le résidu de glycine qui, au contraire, confère une grande liberté à la chaîne. Des carrés avec (◼) et sans point (◻) sont utilisés pour représenter respectivement les résidus de sérine et thréonine, dont la polarité est masquée lorsqu'ils sont impliqués dans des liaisons hydrogènes avec des carbonyles de la chaîne principale, en particulier dans des structures hélicoïdales (Callebaut et al., 1997b).

A)

PrtS *S. thermophilus* LMD-9

B) PrtH *L. helveticus* CNRZ32 CIRM-BIA 103

PrtH *L. helveticus* CNRZ32 CIRM-BIA 103 - suite



C)

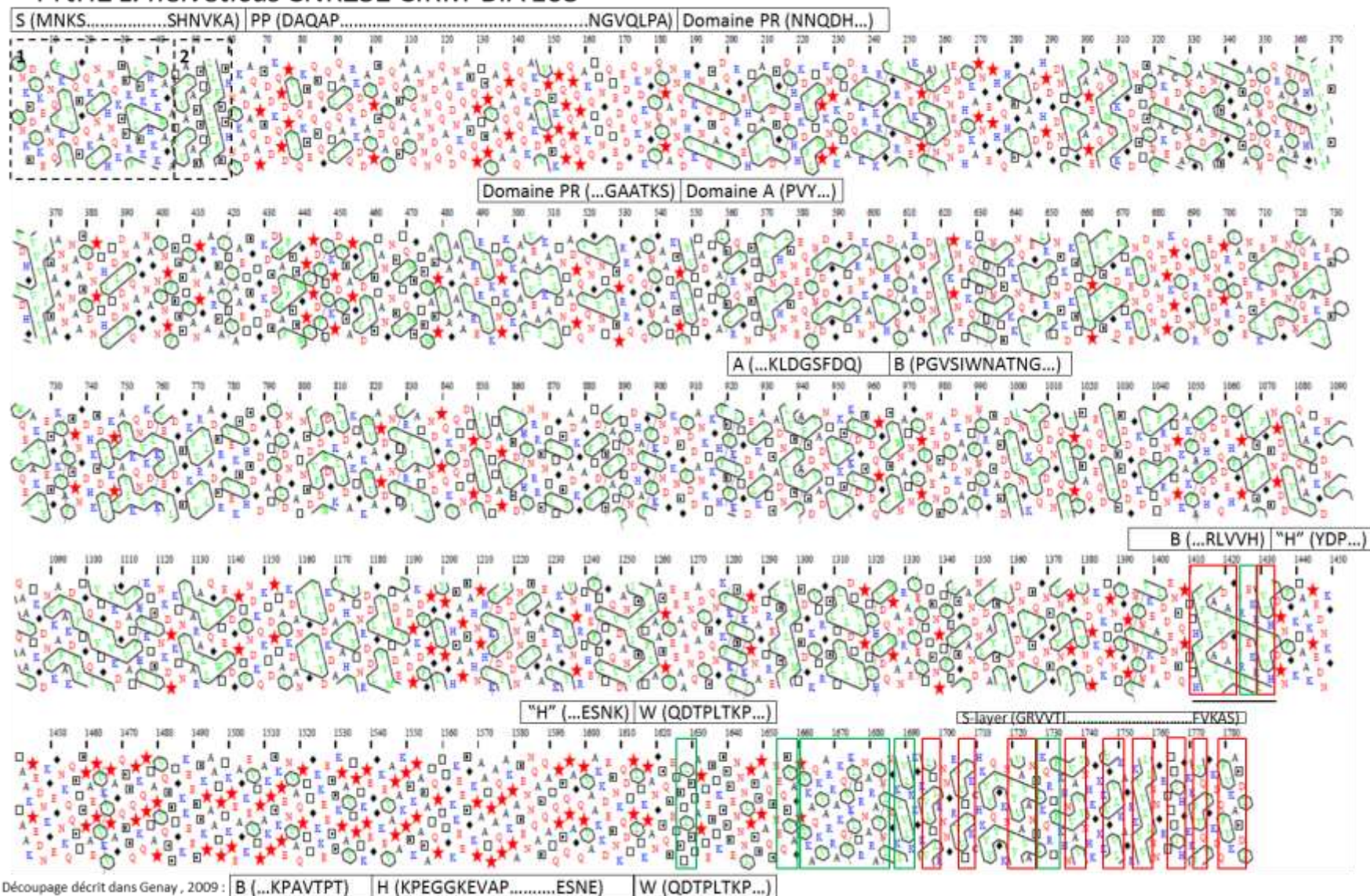
PrtH2 *L. helveticus* CNRZ32 CIRM-BIA 103

Figure 9 : Profils HCA des protéases de paroi PrtS (A), PrtH (B) et PrtH2 (C). Les rectangles situés au-dessus des séquences correspondent aux domaines de ces protéases : la séquence signal (S), le prodomaine (PP), le domaine catalytique (PR), le domaine A (A), le domaine B (B), le domaine hélicoïdal (H), le domaine W (W) et le domaine d'ancrage (AN). Pour chaque domaine, les débuts et fins de séquences sont indiqués entre parenthèses. Pour le domaine S, les régions spécifiques ont été encadrées en pointillés et numérotées 1 et 2. Les motifs S-layer ont aussi été reportés dans les domaines W des protéases PrtH (B) et PrtH2 (C). Pour PrtH2 (C), les délimitations des domaines B, H et W comme définis par Genay et al (2009) ont été représentées en-dessous de la séquence et les délimitations établies dans cette étude sont représentées au-dessus. Les cadres en traits pleins en C-terminal, représentent les séquences prédites par le logiciel GOR IV comme présentant une structure secondaire en brin β (cadres rouges) ou en hélices α (cadres verts).

III.B Les domaines de protéases de paroi *PrtS*, *PrtH* et *PrtH2* :

i). Le peptide signal (S) est facilement reconnaissable (Figure 10 A) par la région comprenant des résidus chargés positivement (cadre 1), suivie de la région hydrophobe (cadre 2) et du site de reconnaissance de la signal-peptidase, défini par des logiciels de bio-informatique comme SignalP (Petersen et al., 2011) ou PredTAT (Bagos et al., 2010). Toutefois, dans le cas de *PrtH*, le site de coupure diffère entre ces logiciels. SignalP prédit une coupure entre les résidus 27 et 28 (AEQ-QV) et PredTAT entre les résidus 24 et 25 (STA-EQ). Nous avons privilégié les bornes de domaines décrites dans la littérature, qui correspondent à la prédiction fournie par le logiciel PredTAT. Les séquences signal de *PrtS*, *PrtH* et *PrtH2* présentent toutes un cluster hydrophobe (cadres 2, Figure 10 A, B et C) qui se démarque du cluster du pro-domaine PP.

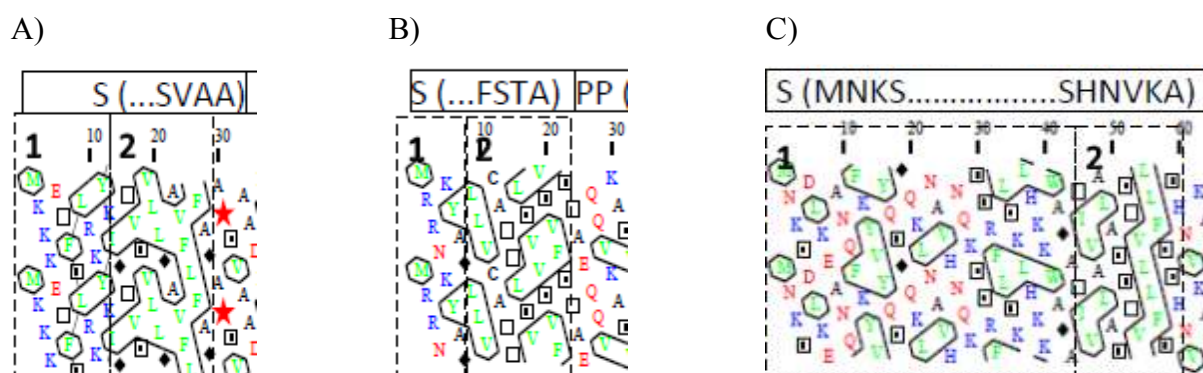


Figure 10 : Représentation HCA des séquences signal des protéases de paroi *PrtS* (A), *PrtH* (B) et *PrtH2* (C). Ce domaine, situé en région N-terminale, est divisé en deux parties par des cadres hachurés numérotés 1 et 2 définissant deux sous-parties de la séquence signal : une région chargée positivement (1) suivie d'une région hydrophobe (2).

ii) Le pro-domaine PP, pour lequel une forte abondance en résidus acides (résidus E et D en rouge ; Figure 9, A et C) est trouvée, présente des points isoélectriques (pI) théoriques de 3,69 et 4,49 pour *PrtS* et *PrtH2*, respectivement. Ces domaines seraient chargés négativement au pH du lait (environ 6,6) et jusqu'à pH 4,6, pH qui est atteint lors de l'acidification du lait par les bactéries lactiques. Le pro-domaine PP de *PrtH* (Figure 9 B), contrairement aux précédents, possède un pI basique de 9,75, ce qui lui confère une charge positive lors de son expression en milieu lait.

iii) Le domaine PR reporté sur les profils HCA est bien conservé. Les clusters hydrophobes sont aisément comparables entre les trois domaines PR de PrtS, PrtH et PrtH2 (Figure 9 A, B et C).

iv) Le domaine A et le début du domaine B ont été définis par homologie de séquence avec les protéases PrtS, PrtP, PrtB, PrtR, PrtH et PrtH2 puis reportés sur les profils HCA.

v) Les domaines hélicoïdaux H correspondent pour PrtS et PrtH à des régions contenant des hélices α . Pour PrtH2, ce domaine ne contient probablement pas d'hélices α compte-tenu du grand nombre de résidus de proline présents dans la séquence déterminée dans la littérature.

vi) Les domaines W des protéases de paroi des bactéries lactiques sont riches en résidus Ser/Thr ou Gly/Pro (Siezen, 1999). Enfin, Le domaine d'ancrage AN de PrtS est retrouvé en position C-terminale. A l'instar du domaine S, le domaine AN de PrtS est facile à délimiter car il débute par le motif LPXTG. Ce domaine est ensuite composé d'une région hydrophobe suivie par une séquence chargée positivement (Chapitre 1 page 57). Les quatre protéases PrtH de *L. helveticus* ne possèdent pas de domaines d'ancrage mais un domaine W au sein duquel un ou plusieurs motifs S-layer (pfam 03217) ont été identifiés par homologie de séquence.

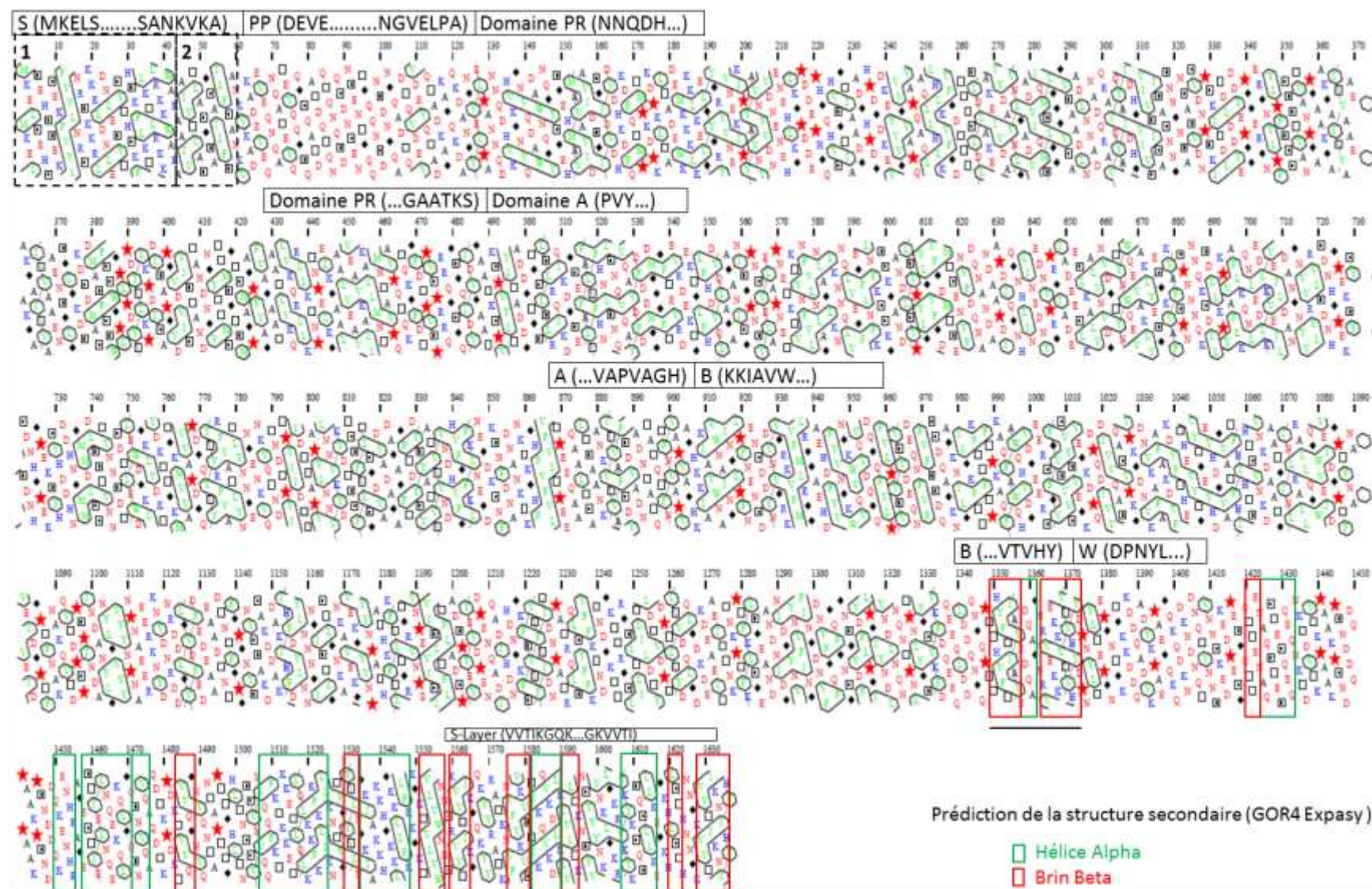
III.C Les protéases de paroi PrtH3 et PrtH4

Les domaines S, PP et PR ont été délimités comme expliqué ci-dessus par homologie de séquence en les comparant aux domaines analogues déjà délimités chez d'autres protéases de bactéries lactiques : PrtS, PrtP, PrtB, PrtR, PrtH et PrtH2 (Sadat-Mekmene et al., 2011a). La limite coté N-terminal du domaine W de PrtH3 et PrtH4 (Figure 11, A et B) a été établie en sachant que les domaines W des protéases de paroi des bactéries lactiques sont riches en résidus Ser/Thr ou Gly/Pro (Siezen, 1999). Ainsi, pour PrtH4, le domaine W commencerait au résidu Phe¹⁴⁰⁹ (Figure 11 B) suivi d'une séquence riche en résidus Pro, Ser et Thr. Enfin, sa région C-terminale présente deux motifs S-layer chevauchants. En ce qui concerne le domaine W de PrtH3 (Figure 11 A), un motif S-layer a été identifié dans la région C-terminale. Ce motif est précédé par une séquence riche en clusters hydrophobes et en résidus Lys qui pourraient s'apparenter à un autre domaine S-layer (région 1510–1555). Enfin la séquence

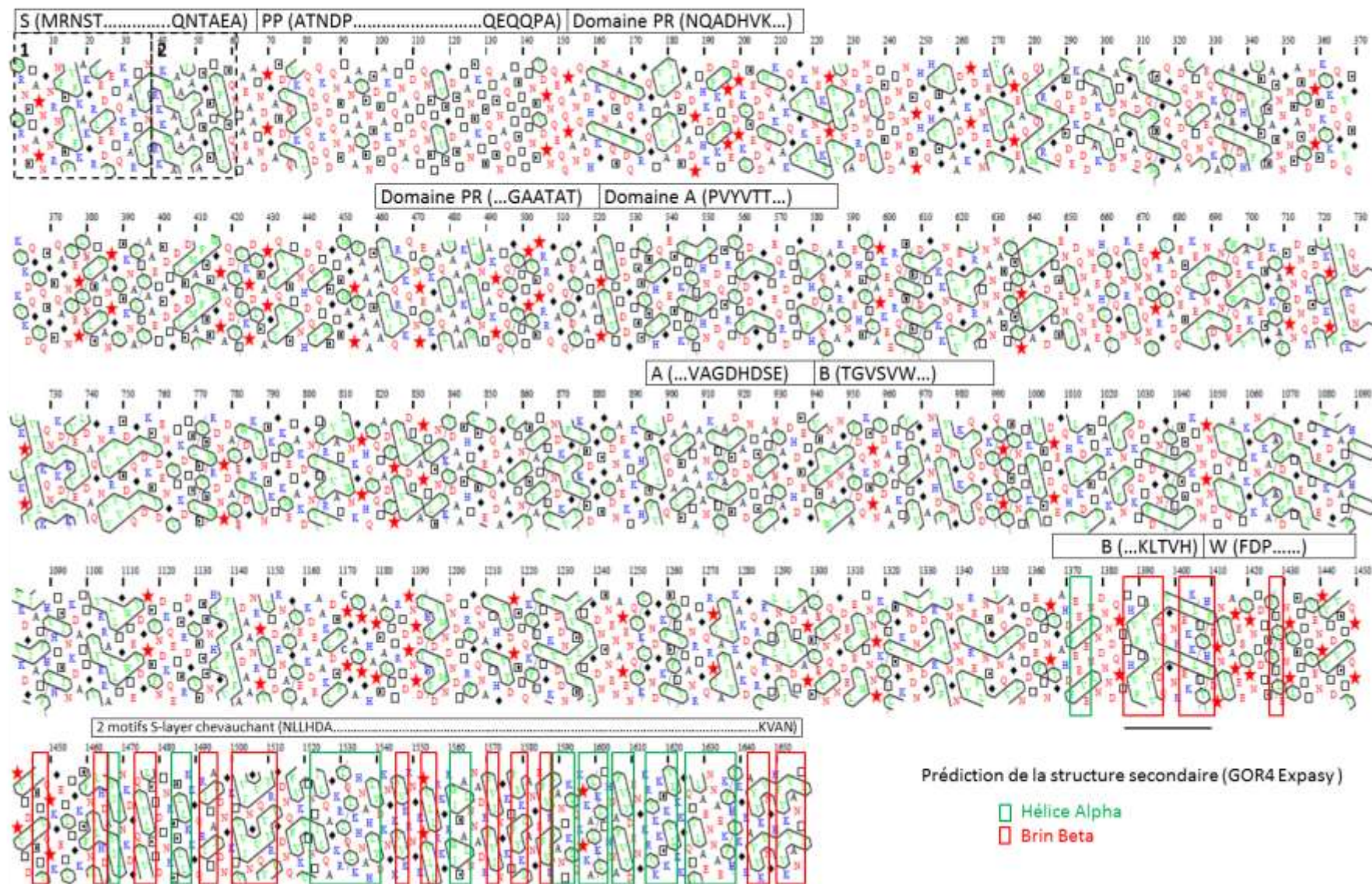
1378–1509 est riche en résidus hydroxylés Ser et Thr et en résidus Pro se conformant ainsi aux caractéristiques du domaine W décrites par Siezen (1999).

Nous avons ensuite recherché des domaines hélicoïdaux, spécifiques au domaine H, en amont du résidu 1378 pour délimiter le domaine B de PrtH3. Pour cela, nous avons utilisé le logiciel GOR4 pour déterminer un modèle de prédiction de structures secondaires. Cependant un cluster hydrophobe dans la région 1349-1372 présenterait une structure secondaire correspondant à deux brins β encadrant une hélice α (trait noir Figure 11 A). Cette première structure importante de brins β rencontrée en amont du résidu 1378 devrait, par définition (Siezen, 1999), appartenir au domaine B plutôt qu'au domaine H. Cela exclurait donc la présence d'un domaine hélicoïdal H dans PrtH3 et délimiterait ainsi les domaines B et W entre les résidus Tyr¹³⁷² et Asp¹³⁷³. Afin de s'assurer qu'il n'y a pas de domaine H dans PrtH3, la présence potentielle d'hélices α a été recherchée dans le domaine W par le logiciel GOR IV. Ainsi, la région 1450-1475 pourrait former une hélice α (cadres verts, Figure 11 A). Cependant, la région comprise entre les résidus 1380 à 1450 (entre la fin du domaine B et le début de l'hélice α) semble peu structurée, avec néanmoins la présence potentielle d'un brin β formé de trois résidus d'acides aminés (Thr-Thr-Glu) en amont d'une hélice α composée de neuf résidus. Ces données structurales ne permettent donc pas de délimiter un domaine hélicoïdal H entre les domaines B et W.

A)

PrtH3 *L. helveticus* CNRZ32 CIRM-BIA 103

B)

PrtH4 *L. helveticus* CNRZ32 CIRM-BIA 103

C)

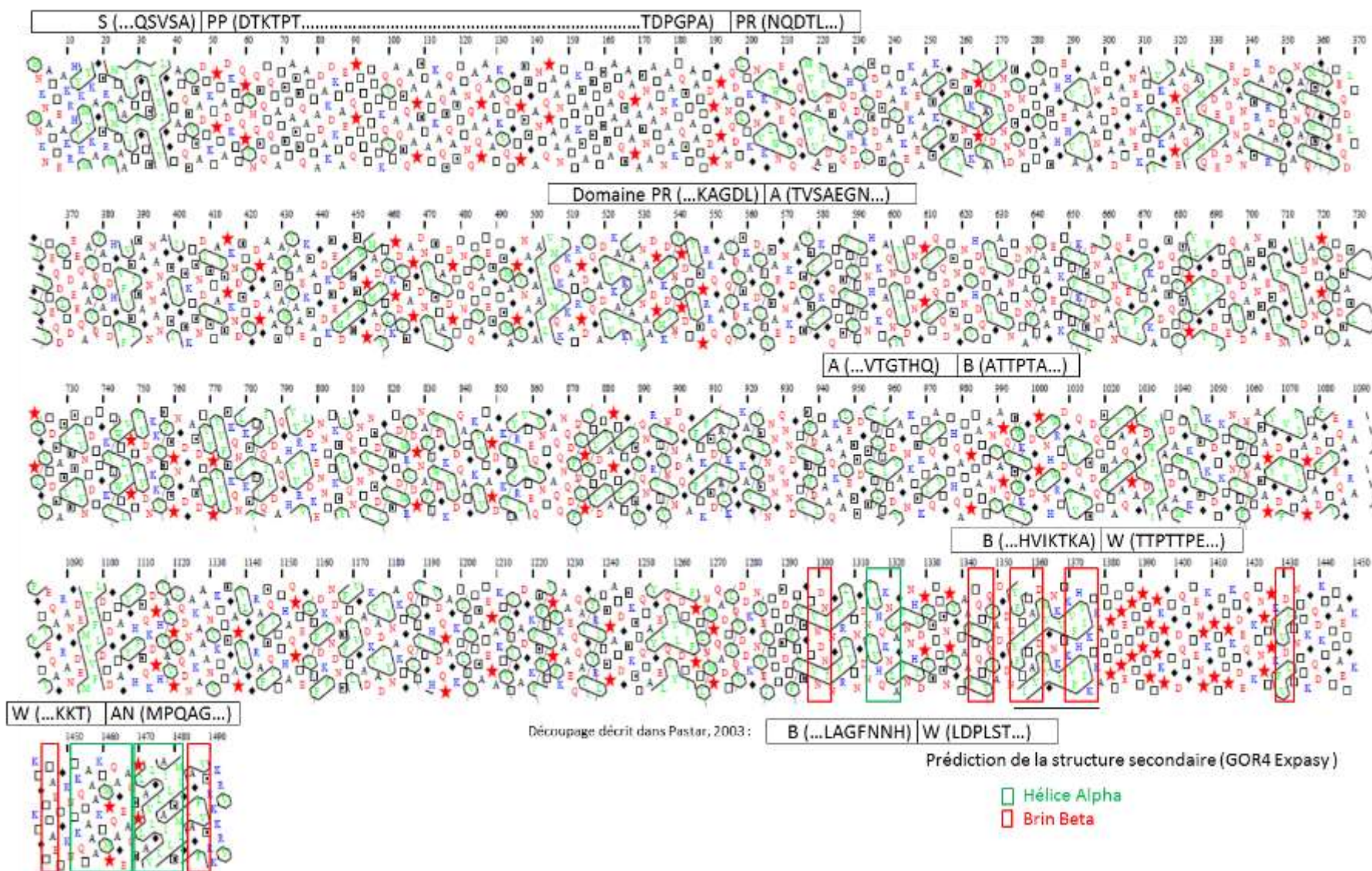
PrtR *L. rhamnosus* GG

Figure 11 : Profils HCA des protéases de paroi PrtH3 (A) et PrtH4 (B) de *L. helveticus* CNRZ32 CIRM-BIA 103 et PrtR (C) de *L. rhamnosus* GG. Les rectangles situés au-dessus des séquences correspondent aux domaines de ces protéases : la séquence signal (S), le prodomaine (PP), le domaine catalytique (PR), le domaine A (A), le domaine B (B), le domaine hélicoïdal (H), le domaine W (W) et le domaine d'ancrage (AN). Pour chaque domaine, les débuts et fins de séquences sont indiqués entre parenthèses. Pour le domaine S, les régions spécifiques ont été encadrées en pointillés et numérotées 1 et 2. Les motifs S-layer ont aussi été reportés dans les domaines W des protéases PrtH3 (A) et PrtH4 (B). Les cadres en traits pleins en C-terminal représentent les séquences prédites par le logiciel GOR IV comme présentant une structure secondaire en brin β (cadres rouges) ou en hélices α (cadres verts).

D'autre part, le cluster hydrophobe décrit chez PrtH3 est relativement bien conservé et a pu être retrouvé par alignement de séquence chez d'autres protéases telles que PrtH2, PrtH4 et PrtR (trait noir ; Figure 11 A, B et C et Figure 12 A, B et C). Cependant, ce cluster n'est pas retrouvé chez PrtH, PrtP ou PrtB.

A)

```

Prth2_CNRZ32  ENLYGPNFNVKEALDDENSQPTTHVFVVAIVDAVGNFV3KRLVVHYDPNFGKTAAPEDNKGEGNKQQS
Prth3_CNRZ32  ENLYGSYKFDQEEQLDDQNGQPTTHVFTIAVEDQAGNRFVEKKVTVHYDPNYLTPGNTGK---KDDQAD
Prth3_LH77    ENLYGSYKFDQEEQLDDQNGQPTTHVFTIAVEDKAGNRFVEKKVTVHYDPNYLTPVNTGK---KDDQAD
Prth4_CNRZ32  TNEYGAHDFEEVENLNDNDQPTTHVFTVYVVDQVGNFVEKKLTVHFDPNYVAPEEVPNTDTS-----
Prth4_R0052   TNEYGAHDFEEVENLNDNDQPTTHVFTVYVVDQVGNFVEKKLTVHFDPNYVAPEEVPNTDTSDTSSNSN
PrtR          SNEYGTAAFTQTYQLADG-----NYFTITAVDMVGNFVEKKVFHVIKTKA--TTPTTPETPTTP---TPT

```

B)

```

GSYKFDQEEQLDDQNGQPTTHVFTIAVEDQAGNRFVEKKVTVHYDPNYLTPGNTGKKDDQADV KPAE
ccccchhhhcccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc

```

C)

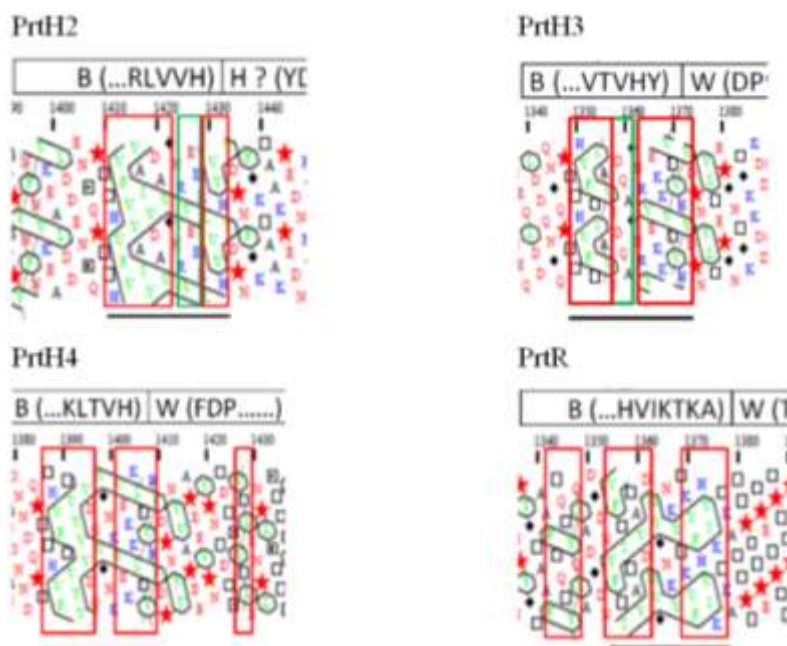


Figure 12 : Recherche d'un motif spécifique à la région C-terminale du domaine B. A) Alignement des séquences de PrtH2, PrtH3 et PrtH4 de *L. helveticus* CNRZ32 CIRM-BIA 103, PrtH4 de *L. helveticus* R0052, PrtH3 de *L. helveticus* ITGLH77 CIRM-BIA 99 et PrtR de *L. rhamnosus* GG comparativement à la séquence 1330-1396 de PrtH3 de *L. helveticus* CNRZ32 CIRM-BIA 103 (logiciel Clustal Omega). B) prédiction de structures secondaires par le logiciel GOR IV sur la séquence de PrtH3 de *L. helveticus* CNRZ32 CIRM-BIA 103. C) Les représentations HCA du motif mis en évidence (souligné en noir) sont présentées pour les protéases PrtH2, PrtH3, PrtH4 et PrtR.

Enfin, comme PrtH3, PrtH4 ne semble pas posséder de domaine H. En effet, la première structure secondaire prédite en amont (*i.e.* côté N-terminal) du domaine W de PrtH4 correspond au cluster hydrophobe précédemment déterminé (trait noir, Figure 11 B et Figure 12 C). De plus aucune structure en hélice α n'a été prédite par Gor4 dans le domaine W ou en amont de PrtH4. Cette absence de domaine H et la localisation du cluster hydrophobe en amont du domaine W nous permettent de formuler l'hypothèse que le cluster hydrophobe pourrait correspondre à la région C-terminale du domaine B. Ce cluster hydrophobe n'avait jusque-là pas été pris en compte pour limiter les domaines B de PrtH2 et PrtB (Genay et al., 2009 ; Pastar et al., 2003 ; Sadat-Mekmene et al., 2011b). Les domaines seraient alors positionnés comme décrit dans la Figure 9 C, Figure 11 A et B et récapitulés Tableau 5.

Tableau 5 : Présentation des domaines des protéases de paroi de *L. helveticus* CNRZ32 CIRM-BIA 103.

	Domaines des protéases de paroi							Références
	S	PP	PR	A	B	H	W	
PrtH	25	176	687	1101	1589	1744	1926	Pederson et al, 1999
PrtH2	64	184	546	962	1537	1610	1786	Présente étude
PrtH2	64	184	546	962	1433	1610	1786	Genay et al, 2009
PrtH3	64	130	492	907	1373	0	1637	Cette étude
PrtH4	65	154	521	938	1409	0	1658	Cette étude

Pour chaque domaine, le dernier résidu d'acide aminé est précisé.

III.D Discussion

Les principales différences structurales prédites *in silico* entre les protéases de paroi de *L. helveticus* et *S. thermophilus* résident essentiellement au niveau des domaines situés aux extrémités des protéases. Cela correspond aux domaines N-terminaux S et PP et aux domaines H et W localisés dans la région C-terminale. Les domaines PR, A et B semblent, quant à eux, conserver les mêmes structures.

Les deux domaines N-terminaux successifs S et PP sont très variables d'une protéase à l'autre tant par la taille que par leurs structures secondaires prédites ou leur charge. Ainsi, deux types de domaines S sont représentés. Chez la plupart des protéines sécrétées par les bactéries à coloration Gram positive, le domaine S est généralement composé d'une trentaine de résidus, comme retrouvé chez PrtS et PrtH. En revanche, les domaines S de PrtH2, PrtH3 et PrtH4 sont atypiques car leur taille est doublée. Cette région supplémentaire pourrait avoir

soit un rôle dans la reconnaissance des protéases par une protéine chaperonne soit permettre une interaction directe avec le système Sec sans l'intermédiaire d'une chaperonne (Fekkes et Driessen, 1999). Il est aussi envisageable que cette séquence joue un rôle dans l'efficacité de la sécrétion des protéases chez *L. helveticus*. En effet, ces deux possibilités peuvent offrir deux schémas de régulation. D'une part, l'utilisation d'une protéine chaperonne devrait assurer le ciblage vers le système de translocation dès la traduction (Fekkes et Driessen, 1999) mais, bien sûr, cette étape pourrait être limitante selon la quantité de chaperonnes produites et/ou la compétition avec d'autres protéines utilisant ces chaperonnes. D'autre part, si cette séquence signal permet aux protéases de « s'auto-diriger » vers le système de translocation sans l'aide d'une chaperonne, cela éviterait la prise en charge des protéases et la reconnaissance de ces protéases pourrait se faire directement par la protéine SecA du système Sec. De plus, quel que soit le système utilisé, une régulation pourrait avoir lieu selon la séquence primaire de la séquence signal et une séquence particulière pourrait alors privilégier la sécrétion. Cela pourrait être le cas avec PrtH3 qui semble plutôt être produite en plus grande quantité que les autres protéases chez la souche CNRZ32.

Les quatre pro-domaines PP sont propres à chaque protéase. Cette différence pourrait jouer un rôle dans la maturation des protéases en permettant de moduler leur activité selon les conditions physicochimiques de l'environnement telles que la force ionique ou la température. En effet, les propriétés de ces pro-domaines sont très variées tant par leur taille que par leur charge ou leur point isoélectrique théorique. Ce dernier paramètre permet de formuler une hypothèse quant à une variation possible de la charge globale du pro-domaine selon le pH. Ainsi lorsque l'acide lactique produit par la cellule abaisse le pH du milieu extérieur, le changement de la charge du pro-domaine pourrait permettre l'activation de la protéase. Cette activation pourrait être catalysée par une maturase (PrtM ou PrtM2).

Les domaines H et W situés en région C-terminale interviendraient respectivement dans l'ancrage et la disposition des protéases sur la paroi. Chez les quatre protéases de *L. helveticus*, les motifs S-layers permettent l'attachement des protéases à divers composants de la paroi (exopolysaccharides de surface, protéines de surface, S-layers...). Malheureusement, ce type d'attachement est encore peu connu et semblerait dépendre de la composition de la paroi cellulaire. Une connaissance plus approfondie des zones d'attachement de ces motifs S-layers au niveau de la paroi pourrait nous donner une meilleure idée de la disposition des protéases au niveau de la paroi. En effet, chez *L. helveticus* comme chez les autres bactéries lactiques, il n'a jamais été déterminé si les domaines catalytiques des protéases étaient situés à l'extérieur de la paroi, au niveau de la couche de S-layers ou encore

dans la paroi. Enfin, la présence d'un domaine H pourrait indiquer que le site actif de la protéase sortirait de la paroi et pourrait ainsi être accessible au substrat. Cependant, à ce jour, le manque de connaissance sur le site d'attachement des domaines S-layer au niveau de la paroi rend difficile la prédiction du positionnement des protéases pariétales qui possèdent un de ces domaines. Afin de mieux comprendre l'organisation réelle des protéases dans la paroi, différentes méthodes d'approches sont maintenant disponibles telles que le « shaving différentiel » utilisant de la trypsine libre ou immobilisée ou encore l'utilisation d'anticorps couplés à des billes d'or pour visualiser les protéases sur la paroi par microscopie électronique.

Cette approche *in silico* basée sur la structure des domaines des protéases de paroi permet ainsi de souligner les différences importantes entre les protéases de paroi des bactéries lactiques, notamment les différences au sein même de l'espèce *L. helveticus*. Cependant, leur domaine PR étant assez proches, il est difficile d'expliquer les fortes différences d'activités spécifiques observées *in vitro* entre PrtH3 et les autres protéases car leur. Par ailleurs, les particularités observées entre les domaines S, PP, H et W, argumentent et nous poussent vers l'exploration d'autres axes de recherche concernant les protéases soit sur leur régulations post-traductionnelles éventuelle, soit leur maturations spécifiques à chacune d'elles ou encore leur disposition au niveau de la paroi.

IV Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons d'abord montré que les quatre protéases pariétales de *L. helveticus* étaient produites par la souche CNRZ32 CIRM-BIA 103 et qu'elles étaient détectées toutes les quatre lors de la phase exponentielle en culture lait. Les souches *L. helveticus* ITGLH77 et R0052 produisaient respectivement une protéase PrtH3 et PrtH4 dans les mêmes conditions de culture que la souche *L. helveticus* CNRZ32.

L'activité du système protéolytique de surface de ces souches a été estimée *in vitro* en regardant la vitesse de dégradation des caséines α_{s1} et β aux pH 7,5 et pH 5,2 et à différentes concentrations en sel. Les activités protéolytiques de souches de *S. thermophilus* exprimant ou non une protéase de paroi ont aussi été testées dans ces mêmes conditions. Ces résultats montrent que les souches exprimant PrtH3, la protéase de paroi ubiquitaire chez *L. helveticus*, présentent une forte activité protéolytique contrairement aux trois autres protéases PrtH, PrtH2 et PrtH4. De plus, seules les fortes concentrations en sel semblent fortement diminuer

l'activité protéolytique et plus particulièrement la vitesse d'hydrolyse de la caséine β . En fromage, quels que soient les levains utilisés, la caséine β semblait plus protéolysée tout au long des 48 jours d'affinage. De plus, la protéolyse globale était majoritairement dépendante des espèces de levains puis des souches utilisées. Ainsi, la souche *L. helveticus* CNRZ32 était plus protéolytique que la souche *L. helveticus* ITGLH77 qui elle-même était bien plus protéolytique que *S. thermophilus*. Concernant, l'effet du sel, seuls les fromages deux fois plus salés ont présenté une diminution significative de leur protéolyse.

A partir de ces résultats, de nouvelles hypothèses ont pu être formulées concernant la présence et la modulation de l'activité des protéases de paroi de *L. helveticus*. La quantité de PrtH3 présentes à la surface de la souche *L. helveticus* ITGLH77 pourrait être plus élevée qu'à la surface de la souche *L. helveticus* CNRZ32. De plus, les autres protéases PrtH, PrtH2 et PrtH4 sembleraient faiblement protéolytiques même si elles pourraient tout de même jouer un rôle indirect dans la protéolyse donner un avantage d'adaptation face aux variations de paramètres environnementaux telles le pH ou la teneur en sel.

L'étude *in silico* a d'abord permis de délimiter des domaines au sein des protéases PrtH3 et PrtH4 en fonction de ceux déjà établis sur les deux autres protéases PrtH et PrtH2 de *L. helveticus*, de les comparer et d'étendre ces comparaisons plus généralement aux autres protéases des bactéries lactiques. Les différences structurales majeures de ces protéases de paroi sont localisées au niveau de leur propeptide et au niveau de leurs domaines situés du côté C-terminal de la protéine après le domaine B. Cela impliquerait donc des différences dans leur maturation et dans leur positionnement au niveau de la paroi. Il est aussi important de noter que PrtH3 et PrtH4 ne semblent pas posséder de domaine hélicoïdal H contrairement à PrtH et PrtH2 et que pour cette dernière ce domaine H ne semble pas être organisé sous forme d'hélice à cause de sa richesse en résidus proline.

Discussion-Conclusion et Perspectives

Les protéases pariétales des bactéries lactiques sont les premiers acteurs de la caséinolyse qui survient lors de la fabrication de laits fermentés et interviennent aussi précocement dans la fabrication des fromages. Leur activité protéolytique permet aux souches de bactéries lactiques les exprimant d'augmenter leur vitesse de croissance et d'atteindre une plus forte densité cellulaire en lait. D'autre part, l'activité des protéases de paroi rencontrées parmi les différentes espèces de bactéries lactiques participe à la formation de peptides possédant des propriétés technofonctionnelles et/ou bioactives.

L'objectif de mon travail de thèse était d'approfondir les connaissances sur les propriétés protéolytiques de *L. helveticus* et *S. thermophilus*, deux bactéries lactiques utilisées comme co-levains dans la fabrication de fromages à pâte pressée cuite tels que l'Emmental et le Comté, en déterminant comment leur système protéolytique de surface pouvait moduler le profil d'hydrolyse des caséines en matrice laitière. Nos deux modèles d'étude, *Streptococcus thermophilus* LMD-9 et *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 CIRM-BIA 103, présentent différentes protéases pariétales : PrtS pour *S. thermophilus* et PrtH, PrtH2, PrtH3 et PrtH4 pour *L. helveticus*. Mon travail de thèse a permis d'approfondir les connaissances sur la contribution de ces cinq protéases de paroi dans l'activité du système protéolytique de surface de nos deux modèles.

Nous avons caractérisé l'activité des systèmes protéolytiques de surface *in vitro* et *in situ*. Tout d'abord, nous avons démontré par shaving que les quatre protéases de *L. helveticus* CNRZ32 CIRM-BIA 103 étaient produites en lait au cours de la phase exponentielle de croissance. De même, la protéase PrtS était produite chez *S. thermophilus*, au cours de la phase exponentielle en culture lait. De plus, chez toutes les souches testées, les hydrolyses *in vitro* ont montré une activité caséinolytique plus forte à pH 5,2, le pH de l'Emmental, qu'à pH 7,5, pH habituellement utilisé pour caractériser les activités des protéases de surface. D'ailleurs, les données sur la protéolyse des fromages, avant la lyse cellulaire, corroborent les tendances observées lors des expérimentations *in vitro* à pH 5,2 à savoir : i) une plus forte dégradation de la caséine β que de la caséine α_{s1} ; ii) une plus forte activité sur la caséine β du système protéolytique de la souche ITGLH77 que celui de la souche CNRZ32 ainsi qu'une meilleure efficacité des systèmes protéolytiques des lactobacilles que ceux des streptocoques dans nos conditions expérimentales ; iii) un plus fort degré d'hydrolyse dans les fromages avec le système protéolytique de *L. helveticus* CNRZ32, composé de quatre protéases de paroi, que dans ceux produits avec *L. helveticus* ITGLH77, qui ne possède que PrtH3. Enfin, *in vitro*, les variations de teneur en sel induisaient uniquement une diminution de la vitesse de

dégradation des caséines en présence de fortes teneurs en sel ($> 1,5\%$ NaCl/volume). Il est à noter qu'en fin d'affinage des fromages, bien que la caséinolyse observée soit le résultat de l'activité de tout le système protéolytique des levains (extra- et intracellulaire), la caséinolyse semblait aussi inhibée en présence d'une forte teneur en sel.

A partir de ces résultats et grâce à l'absence de protéolyse par les souches ne produisant pas de protéase de paroi, la vitesse de dégradation des caséines a pu être assimilée à l'activité des protéases de paroi dans ces systèmes protéolytiques de surface. Ainsi, dans les conditions expérimentales testées, seules les souches exprimant au moins PrtH3 présentaient une activité protéolytique élevée (vitesse de dégradation avoisinant les $6\%/min$), à savoir la souche ITGLH77, qui présente uniquement PrtH3, et la souche CNRZ32 qui possède les 4 protéases. De plus, d'après les tests en conditions *in vitro*, la quantité de PrtH3 actives semblait plus importante chez la souche ITGLH77 que chez la souche CNRZ32 et d'après les résultats de shaving de la souche CNRZ32, PrtH3 pourrait soit être présente en quantité plus importante soit avoir une plus grande accessibilité au substrat que les autres protéases. Enfin, l'activité des systèmes protéolytiques des souches de *L. helveticus* arborant au moins PrtH3 présentaient une vitesse de dégradation des caséines jusqu'à deux fois supérieure à celle des systèmes protéolytiques de *S. thermophilus* arborant PrtS.

En ce qui concerne les trois autres protéases de *L. helveticus*, la souche *L. helveticus* R0052, produisant uniquement la protéase PrtH4, présentait une faible activité d'hydrolyse de la caséine β (vitesse de dégradation $< 1\%/min$). L'activité de PrtH2 n'a pu être testée car, lors de ce travail, aucune souche n'exprimant seulement cette protéase n'a pu être obtenue. Récemment, le séquençage de la souche *L. helveticus* CIRM-BIA 953 de la collection du CIRM a révélé que seul le gène *prtH2* était présent dans son génome. Cependant la comparaison de la croissance en lait de cette souche et de la souche CNRZ32 a révélé une très faible croissance de la souche CIRM-BIA 953 ce qui suggère une faible activité protéolytique chez cette souche. De même, l'activité de PrtH n'a pu être mise en évidence car aucune croissance en lait n'a été observée chez la souche sauvage de *L. helveticus* UPR14, portant uniquement le gène *prtH* et après une culture en milieu MRS, le shaving n'a cependant pas permis de mettre en évidence la production de cette protéase à la surface. De plus, la méthode alternative qui a consisté à exprimer *prtH* de la souche CNRZ32 de façon hétérologue chez *S. thermophilus* LMD-9 n'a pas permis non plus de détecter une activité protéolytique chez les souches mutantes.

Enfin, les résultats de l'expression hétérologue de PrtH chez *S. thermophilus* LMD-9 ont mis en évidence une sécrétion des protéases de paroi PrtH et PrtH⁺WANS à la surface de la cellule. Cependant, l'inactivité de ces protéases pourraient, au regard des tests *in vitro*, être expliquée par la trop faible activité protéolytique de PrtH chez *L. helveticus*. Il est à noter que PrtH2 a aussi été exprimée chez *S. thermophilus* (résultats non présentés) mais aucune activité protéolytique n'a pu, non plus, être détectée à la surface du mutant. Tout comme pour PrtH, il est possible que l'activité protéolytique de PrtH2 soit trop faible pour être détectée ou bien qu'elle nécessite l'action d'une maturase (PrtM ou PrtM2) pour cliver son pro-peptide et la rendre active. Par ailleurs, le système protéolytique de *S. thermophilus*, arborant PrtS, paraît bien moins efficace que ceux de *L. helveticus*, arborant au moins PrtH3, tant *in vitro* qu'en fromage, mais semble plus efficace que le système protéolytique arborant PrtH4 de la souche R0052 en conditions *in vitro*.

Donc, dans les conditions expérimentales testées, les résultats obtenus *in vitro* et *in situ* s'accordent tous sur une forte activité de PrtH3 chez les souches de *L. helveticus* et une plus faible activité protéolytique des trois autres protéases de paroi PrtH, PrtH2 et PrtH4. Ces résultats soulèvent de nouvelles questions :

1) Quelles sont les particularités de PrtH3 qui pourraient lui conférer une telle activité ?

Compte-tenu des différences d'activité protéolytique entre la souche CNRZ32 (quatre protéases) et la souche ITGLH77 (PrtH3 uniquement) et des faibles activités des souches n'exprimant qu'une seule protéase PrtH, PrtH2 ou PrtH4, il semblerait que PrtH3 soit la seule protéase qui confère une forte activité protéolytique aux souches de *L. helveticus*.

La plus forte protéolyse observée dans le cas de la souche ITGLH77 est probablement le résultat d'une production plus importante de la protéase PrtH3 chez cette souche, que dans le cas de la souche CNRZ32. En effet, *in vitro*, la vitesse maximale de dégradation de la caséine β ne semble pas dépasser un plateau avoisinant les 6%/min. Ce plateau est atteint par la souche CNRZ32 à pH 5,2 mais sa vitesse maximale de dégradation est divisée par deux à pH 7,5. Le pH semble donc jouer un rôle sur l'activité caséinolytique des quatre protéases de la souche CNRZ32. L'activité protéolytique de la souche ITGLH77, qui ne possède que PrtH3, atteint ce plateau à pH 5,2 et à pH 7,5. Il est possible d'expliquer ces résultats par une

quantité plus importante de PrtH3 active dans les échantillons de la souche ITGLH77 que dans ceux de la souche CNRZ32. En effet, un ratio enzyme/substrat plus élevé permettrait de compenser la baisse d'activité à pH 7,5 observée chez la souche CNRZ32.

De plus, chez *L. helveticus* CNRZ32, la protéase PrtH3 serait présente en quantité plus importante à la surface que les autres protéases de paroi. En effet, les résultats du shaving de la souche CNRZ32, même s'ils ne sont que semi-quantitatifs, suggèrent que PrtH3 est plus fortement détectée que les trois autres protéases pariétales. Bien que cela puisse être le résultat d'une meilleure accessibilité à la trypsine lors du shaving, ce résultat peut signifier que PrtH3 serait produite en plus grande quantité que les trois autres protéases.

2) Quelle est l'utilité pour la souche *L. helveticus* CNR32 d'exprimer simultanément les quatre protéases, alors que seule PrtH3 semble active?

Que PrtH3 ait une meilleure accessibilité au substrat et/ou qu'elle soit produite en quantité plus importante que les trois autres protéases, ces dernières semblaient, dans nos conditions expérimentales, peu capables d'hydrolyser les caséines α_{s1} ou β . Pourtant, les fromages produits avec *L. helveticus* CNRZ32 présentaient un plus fort degré de protéolyse que les fromages produits avec *L. helveticus* ITGLH77 et l'hydrolyse de la caséine α_{s1} par le système protéolytique de la souche CNRZ32, en conditions *in vitro*, semblait moins impacté par l'absence de sel que la souche ITGLH77. En effet, la dégradation de la caséine α_{s1} par *L. helveticus* ITGLH77 est fortement diminuée en absence de sel à pH 5,2 comme à pH 7,5 alors que la souche CNRZ32 ne semble pas impactée aux deux pH. L'activité de PrtH3 serait donc diminuée en absence de sel chez la souche ITGLH77. Il est possible qu'en absence de sel, l'activité observée chez la souche CNRZ32 provienne non pas uniquement de PrtH3 mais des autres protéases de paroi. Ainsi, la baisse d'activité de PrtH3 serait compensée par les autres protéases chez CNRZ32. Ces trois protéases pourraient donc être plus actives selon les microenvironnements.

Par ailleurs, alors que la majorité des bactéries lactiques ne possèdent généralement qu'une seule protéase de paroi, *L. helveticus* semble faire exception car certaines de ses souches peuvent posséder jusqu'à quatre protéases. Cependant, nos résultats tendent à montrer que même si certaines souches de *L. helveticus* peuvent présenter ces quatre protéases de paroi en même temps, seule PrtH3 semble fortement active sur les caséines bovines.

L. helveticus ne présenterait alors que peu de différences avec les autres bactéries lactiques. Les trois autres protéases de paroi présenteraient, pour leur part, une activité protéolytique secondaire. En effet, PrtH, PrtH2 et/ou PrtH4 pourraient poursuivre la protéolyse les fragments de caséines libérés par PrtH3. Ceci pourrait apporter un bénéfice à la cellule en produisant plus de peptides internalisables par les systèmes de transport de peptides. Cette hypothèse repose sur la plus forte quantité de produits de protéolyse observée, dès le premier jour de fabrication, dans les fromages produits avec la souche CNRZ32 que dans ceux produits avec la souche ITGLH77 et sans souche de lactobacille. Dans ce cas, ces trois protéases de paroi joueraient plutôt un rôle de peptidase dans la protéolyse et leur particularité serait d'être ancrées à la paroi et de posséder des domaines similaires aux protéases pariétales. Une peptidase ancrée à la paroi comme les protéases pariétales a déjà été rencontrée chez *S. gordonii* (Vickerman et al., 2007) et présentait une séquence signal du côté N-terminal et un domaine W suivi d'un motif d'ancrage de type LPXTG du côté C-terminal. Donc l'hypothèse selon laquelle PrtH, PrtH2 et/ou PrtH4 sont des peptidases pourrait expliquer la faible activité caséinolytique de PrtH4 sur les caséines natives tout comme le faible potentiel protéolytique des souches possédant les gènes *prtH* ou *prtH2* observé en culture lait. De même l'absence d'activité protéolytique observée chez les mutants de *S. thermophilus* exprimant de façon hétérologue les protéases PrtH, PrtH⁺WANS ou PrtH2 pourraient provenir du fait que la bonne activité n'a pas été testée puisque ceux-ci ciblaient une activité protéasique et non peptidasique soit en comparant les croissances en lait ou en utilisant des substrats synthétiques spécifiques des protéases (Sadat-Mekmene et al., 2011b). Des tests visant à rechercher des activités peptidasiques pourraient être mis en place, bien que la présence d'aminopeptidases à la surface de *S. thermophilus* (Hafeez, 2013) pourrait parasiter la détection de l'activité de PrtH, PrtH⁺WANS ou PrtH2.

Enfin, d'un point de vue structural, PrtH et PrtH2 possèdent toutes les deux un domaine « H » du côté C-terminal retrouvé aussi chez PrtS de *S. thermophilus* et PrtP de *Lc. lactis*. Cependant, ce domaine semble absent chez les protéases PrtH3 et PrtH4 tout comme chez PrtR de *L. rhamnosus* ou PrtB chez *L. bulgaricus*. Cette différence pourrait jouer sur le positionnement de leur domaine catalytique en les éloignant de la surface de la paroi de *L. helveticus* (Siezen, 1999). En effet, ce domaine H pourrait être assimilé comme un bras permettant aux protéases PrtH et PrtH2 d'accéder à des substrats éloignés de la paroi. En tenant compte de cette hypothèse, lors du shaving réalisé sur la souche CNRZ32, ces deux protéases de paroi devaient alors être facilement accessibles à la trypsine. Leur faible

abondance par rapport à celle de PrtH3 ne s'expliquerait donc pas par une moins bonne accessibilité mais par une plus faible production de PrtH et PrtH2 par rapport à PrtH3.

3) Comment l'expression et la sécrétion des quatre protéases de *L. helveticus* peuvent-elles être régulées ?

En ce qui concerne les différences potentielles d'expression entre les protéases de paroi, il est possible qu'une première régulation ait lieu au niveau transcriptionnel. En effet, les séquences promotrices en amont des séquences codantes des gènes des protéases diffèrent entre elles (52 à 54% d'identité). Cependant, une deuxième régulation post-traductionnelle pourrait aussi influencer l'expression de ces protéases et leur maturation. En effet, les séquences signal des 4 protéases de paroi de *L. helveticus* CNRZ32 CIRM-BIA 103 diffèrent par leur taille. Les protéases PrtH2, PrtH3 et PrtH4 présentent des séquences signal atypiques de plus de 60 résidus d'acides aminés. Seule la séquence signal de PrtH, composée de 25 résidus d'acides aminés, est comparable à de nombreuses séquences signal identifiées chez les procaryotes. En comparant les séquences signal atypiques de PrtH2, PrtH3 et PrtH4 à celles des protéases pariétales des bactéries lactiques, il apparaît que leurs extrémités C-terminales sont fortement similaires aux peptides signal classiques comme ceux de PrtH et PrtS. Cependant, les extrémités N-terminales de ces trois séquences signal atypiques présentent plus de 30 résidus supplémentaires. Trois hypothèses peuvent être formulées quant au rôle de cette région supplémentaire dans la sécrétion des protéases : i) cette région pourrait être un motif de reconnaissance d'une protéine chaperonne spécifique des protéases des lactobacilles, comme des chaperonnes surexprimées en réponse à des stress telles que les « heat shock proteins » (DnaK, DnaJ, GrpE...) ; ii) elle pourrait permettre à la protéase d'interagir directement avec le système Sec sans avoir besoin d'une chaperonne comme cela a déjà été démontré chez d'autres espèces (Fekkes et Driessen, 1999) ; iii) cette région à longueur variable est aussi retrouvée dans les peptides signaux de type II qui guident les protéines sécrétées vers le système Tat (Petit et al., 2001 ; Hutchings et al., 2009). Il serait donc envisageable que PrtH2, PrtH3 et PrtH4 soient sécrétées *via* le système Tat. Cependant, la séquence RR (deux arginines) typique de l'adressage au système Tat n'est pas retrouvée dans aucune des séquences signal de ces trois protéases et le logiciel PredTAT ne prédit pas cette séquence comme une séquence signal de type II. Enfin, il est à noter que la forte expression de PrtH3 pourrait-être en partie due à ces 30 résidus supplémentaires car leur séquence est peu

conservée entre les protéases PrtH2, PrtH3 et PrtH4 impliquant probablement des régulations différentes dans la sécrétion de ces protéases.

De plus, ce domaine S particulier pourrait permettre de cibler une zone de sécrétion au niveau de la paroi. En effet, selon la répartition des systèmes Sec sur la membrane plasmique, la localisation de la sécrétion des protéases pourrait se produire au niveau du site de division de la cellule (septum) ou à ses pôles apicaux. D'après les dernières études réalisées chez différentes espèces bactériennes à coloration Gram positive (cf. Chapitre 1 sécrétion et les peptides signal p. 55), ce type de régulation peut varier selon l'espèce étudiée. La disposition des protéases pariétales à la surface pourrait donc varier selon l'espèce. Quoiqu'il en soit, chez *S. thermophilus*, la protéase PrtS devrait être sécrétée au niveau de l'une des deux zones : pôles ou septum, puis converger vers l'autre zone tout en suivant l'expansion du peptidoglycane et recouvrir ainsi la surface cellulaire, comme le démontrent Brega *et al.* (2013) chez *Streptococcus agalactiae*. Chez *L. helveticus*, Lortal *et al.* (1992) ont montré qu'après avoir détaché les S-layer par des traitements au chlorure de lithium (LiCl) à 5 mM et remis ces cellules en culture, le manteau de S-layer se reformait de façon erratique sur la paroi. Cette étude tend à montrer que les systèmes de sécrétion chez *L. helveticus* seraient disséminés partout sur la membrane et non pas sur l'axe du site de division de la cellule comme chez les streptocoques. Cependant il serait aussi possible que, comme chez certaines espèces telles que *Bacillus anthracis* ou *Clostridium difficile*, les protéines sécrétées, dont les S-layers, ne soient pas sécrétées aléatoirement sur la paroi, voire même que les S-layers possèdent leurs propres système de sécrétion (Schneewind et Missiakas 2012). Il pourrait alors en être de même pour les protéases de paroi possédant ce domaine S particulier.

Enfin, une dernière régulation post-traductionnelle pourrait intervenir dans la maturation des protéases de paroi *via* la nature des pro-peptides. Comme il a été souligné précédemment (Chapitre 2, *in silico*, p. 158), les pro-peptides des quatre protéases de paroi de *L. helveticus* diffèrent tous les uns des autres et le processus de maturation pourrait différer en fonction de facteurs extérieurs (microenvironnement, maturases, ...). Par ailleurs, l'activité des protéases de paroi des *L. helveticus* pourrait aussi dépendre de l'intervention de maturases telles que PrtM et PrtM2 (Broadbent *et al.*, 2011). En effet, PrtM est une lipoprotéine ancrée à la membrane du côté N-terminal un résidu cystéine et il a été montré chez *Lc. lactis* que PrtM était nécessaire pour maturer la protéase à sérine PrtP (Haandrikman *et al.*, 1991 ; Vos *et al.*, 1989 ; Drouault *et al.*, 2002). Cette hypothèse pourrait expliquer l'absence d'activité des protéases PrtH et PrtH⁺WANS exprimées chez *S. thermophilus*. Afin de vérifier cette dernière

hypothèse, il serait envisageable d'exprimer *prtM* de *L. helveticus* chez les souches de *S. thermophilus* exprimant déjà PrtH et PrtH⁺WANS. Cependant, au vu de nos résultats prouvant la forte activité protéolytique de PrtH3, son expression hétérologue chez *S. thermophilus* avec ou sans sa maturase (PrtM ou PrtM2) permettrait de confirmer ou non nos hypothèses concernant la forte activité de PrtH3 dans le système protéolytique pariétal de *L. helveticus*.

Pour conclure, mon travail de thèse a répondu en partie à la question de l'activité des quatre protéases de paroi de *L. helveticus* CNRZ32 CIMR-BIA 103 et amené de nouvelles questions de recherche. En effet, PrtH3, en plus d'être la protéase ubiquitaire parmi les souches de *L. helveticus* testées (Broadbent et al., 2011), apparaît dans nos conditions expérimentales comme étant la seule protéase possédant une forte activité protéolytique sur les caséines α_{s1} et β . Les trois autres protéases, faiblement protéolytiques, semblent participer différemment à la protéolyse des caséines potentiellement en réalisant une seconde hydrolyse des produits de dégradation des caséines et/ou en capturant ces dernières pour qu'elles puissent être dégradées plus efficacement par PrtH3.

Le travail réalisé durant cette thèse ouvre les perspectives suivantes :

- Déterminer la nature de l'activité PrtH, PrtH2 et PrtH4, protéolytique ou peptidasique. Dans ce but, des substrats issus d'une première protéolyse des caséines pourraient être utilisés afin de valider si elles peuvent ou non protéolyser des peptides. Il serait alors envisageable de réaliser de nouvelles hydrolyses *in vitro* à pH 5.2 avec des souches de *L. helveticus* ne produisant qu'une seule protéase telle que la souche R0052 (PrtH4) en utilisant les caséines α_{s1} et β préalablement hydrolysées par la souche de *L. helveticus* ne possédant que PrtH3 ou des fragments spécifiques des caséines tels que des peptides chargés positivement ou négativement ou des peptides ayant des profils d'hydropathie spécifiques, voire le fragment 1-23 de la caséine α_{s1} .

- Persévérer dans l'expression hétérologue des protéases de paroi de *L. helveticus* afin de produire une protéase active. Jusqu'ici, mon travail de thèse a permis de mettre au point avec succès un système d'expression et de sécrétion de protéine couplé à un système d'ancrage des protéines à la paroi. D'après nos résultats de protéolyse, PrtH3 semble être la meilleure candidate pour être exprimée de façon hétérologue chez *S. thermophilus* et ainsi détecter une activité protéolytique à la surface de la cellule. Il est important de noter que d'autres constructions pourraient être réalisées dès lors qu'une l'activité protéolytique aura été

détectée. En effet, les études *in silico* nous ont permis de mieux cerner la structure des protéases de paroi et pourront être utilisées afin de produire le plus efficacement possible des protéases actives. Nous pourrions alors tester différentes fusions entre la protéase d'intérêt et le système d'ancrage spécifique de *S. thermophilus* comme cela a été réalisé sur la protéase PrtH⁺WANS, et tester le système de maturation en co-exprimant un des gènes de maturase retrouvés chez *L. helveticus* (PtrM ou PrtM2). Ces mutants, une fois produits, pourraient alors être inclus dans les expérimentations de protéolyse *in vitro* ou permettraient de purifier la protéase en la libérant dans le milieu grâce à l'inactivation de gène de la sortase A (SrtA) (Ahoefa Awussi et Clarisse Perrin, communication personnelle).

- Tester *in vitro* les hypothèses développées d'après les études *in silico*. Au cours de ce travail, les protéases pariétales de *L. helveticus* et *S. thermophilus* ont été étudiées *in silico* et des domaines ont été délimités. Cependant, chez *L. helveticus*, il est encore impossible de déterminer la répartition spatiale des protéases au niveau de la paroi. En effet les motifs d'attachement de type S-layer ne permettent pas de prédire à quelle profondeur les protéases s'attachent dans la paroi et donc d'estimer quelle partie de ces protéases seraient dans la paroi, dans le manteau ou à la surface de cette paroi. Une localisation précise de ces domaines au niveau de la paroi pourrait être observée par immunogold en microscopie électronique à transmission. Cette technique nécessiterait la production d'anticorps séquentiels dirigés contre les différents domaines des protéases afin de déterminer si ces domaines sont sur ou dans la paroi. Cependant, des premiers essais ont été réalisés avec des anticorps séquentiels dirigés contre le domaine catalytique des protéases PrtH et PrtH2 en dot blot et western blot mais des problèmes d'aspécificité rencontrés avec les anticorps secondaires demandent des études plus approfondies avant de passer à l'immunogold. Par ailleurs, afin de localiser les protéases sur la paroi, l'utilisation de la microscopie à force atomique (AFM) pourrait déterminer si les protéases des parois sont présentes en dehors du manteau de S-layer. Le principe consisterait à utiliser l'affinité des protéases de paroi, notamment PrtH3, pour les caséines β en fixant ces caséines sur la pointe utilisée pour l'AFM. Cette affinité pourrait être détectée par l'AFM et permettrait ainsi de cartographier les protéases à la surface du manteau de S-layer recouvrant la surface de *L. helveticus*.

- Enfin, l'outil *S. thermophilus* ouvre la voie à de nouvelles possibilités (cf revue soumise à Food Microbiology et présentée en Annexe). Concernant plus particulièrement les protéases de paroi, l'expression hétérologue permettrait de construire des protéases à façon dans le but de définir les fonctions de chaque domaine des protéases de paroi, mais aussi de

Discussion-Conclusion et Perspectives

moduler les activités protéolytiques des protéases afin de les optimiser pour produire des hydrolysats riches en peptides d'intérêt tels que les peptides bioactifs.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abouhamad W. et Manson M.** (1994). The dipeptide permease of *Escherichia coli* closely resembles other bacterial transport systems and shows growth phase dependent expression, *Molecular Microbiology*, 14, **5**, p.1077-1092.
- Alloing G., De Philip P. et Claverys J.-P.** (1994). Three Highly Homologous Membrane-bound Lipoproteins Participate in Oligopeptide Transport by the Ami System of the Gram-positive *Streptococcus pneumoniae*, *Journal of Molecular Biology*, 241, **1**, p.44-58.
- Alves R.A. et Payne J.W.** (1980). The number and nature of the peptide-transport systems of *Escherichia coli*: characterization of specific transport mutants, *Biochem. Soc. Trans.*, 8, **6**, p.704-705.
- Ardö Y. et Pettersson H.-E.** (1988). Accelerated cheese ripening with heat treated cells of *Lactobacillus helveticus* and a commercial proteolytic enzyme, *Journal of Dairy Research*, 55, **02**, p.239-245.
- Åvall-Jääskeläinen S. et Palva A.** (2005). Lactobacillus surface layers and their applications, *FEMS Microbiology Reviews*, 29, **3**, p.511-529.
- Åvall-Jääskeläinen S., Hynönen U., Ilk N., Pum D., Sleytr U.B. et Palva A.** (2008). Identification and characterization of domains responsible for self-assembly and cell wall binding of the surface layer protein of *Lactobacillus brevis* ATCC 8287, *BMC microbiology*, 8, p.165.
- Azcarate-Peril M.A., McAuliffe O., Altermann E., Lick S., Russell W.M. et Klaenhammer T.R.** (2005). Microarray analysis of a two-component regulatory system involved in acid resistance and proteolytic activity in *Lactobacillus acidophilus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 71, **10**, p.5794-5804.
- Bae T. et Schneewind O.** (2003). The YSIRK-G/S motif of staphylococcal protein A and its role in efficiency of signal peptide processing, *Journal of Bacteriology*, 185, **9**, p.2910-2919.
- Bagos P.G., Nikolaou E.P., Liakopoulos T.D. et Tsirigos K.D.** (2010). Combined prediction of Tat and Sec signal peptides with hidden Markov models, *Bioinformatics*, 26, **22**, p.2811-2817.
- Balaban M., Battig P., Muschiol S., Tirier S.M., Wartha F., Normark S. et Henriques-Normark B.** (2014). Secretion of a pneumococcal type II secretion system pilus correlates with DNA uptake during transformation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, **7**, p.E758-E765.
- Bartels H.J., Johnson M.E. et Olson N.F.** (1987a). Accelerated ripening of Gouda cheese. 1. Effect of heat-shocked thermophilic lactobacilli and streptococci on proteolysis and flavor development, *Milchwissenschaft*, 42, **2**, p.83-88.
- Bartels H.J., Johnson M.E. et Olson N.F.** (1987b). Accelerated ripening of Gouda cheese. 2. Effect of freeze-shocked *Lactobacillus helveticus* on proteolysis and flavor development, *Milchwissenschaft*, 42, **3**, p.139-144.
- Beck K., Wu L.F., Brunner J. et Muller M.** (2000). Discrimination between SRP- and SecA/SecB-dependent substrates involves selective recognition of nascent chains by SRP and trigger factor, *Embo Journal*, 19, **1**, p.134-143.

- Bensing B.A. et Sullam P.M.** (2002). An accessory sec locus of *Streptococcus gordonii* is required for export of the surface protein GspB and for normal levels of binding to human platelets, *Molecular Microbiology*, 44, 4, p.1081-1094.
- Blanc B., Laloi P., Atlan D., Gilbert C. et Portalier R.** (1993). Two cell-wall-associated aminopeptidases from *Lactobacillus helveticus* and the purification and characterization of APII from strain ITGL1, *Journal of general microbiology*, 139, 7, p.1441-1448.
- Bolotin A., Quinquis B., Renault P., Sorokin A., Ehrlich D.S., Kulakauskas S., Lapidus A., Goltsman E., Mazur M., Pusch G.D., Fonstein M., Overbeek R., Kyprides N., Purnelle B., Prozzi D., et al.** (2004). Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*, *Nature Biotechnology*, 22, 12, p.1554-1558.
- Boot H.J., Kolen C.P. et Pouwels P.H.** (1995). Identification, cloning, and nucleotide sequence of a silent S-layer protein gene of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 which has extensive similarity with the S-layer protein gene of this species, *Journal of Bacteriology*, 177, 24, p.7222-7230.
- Borezee E., Pellegrini E. et Berche P.** (2000). OppA of *Listeria monocytogenes*, an oligopeptide-binding protein required for bacterial growth at low temperature and involved in intracellular survival, *Infection and Immunity*, 68, 12, p.7069-7077.
- Brega S., Caliot E., Trieu-Cuot P. et Dramsi S.** (2013). SecA Localization and SecA-Dependent Secretion Occurs at New Division Septa in Group B Streptococcus, *Plos One*, 8, 6, p.e65832.
- Broadbent J.R., Cai H., Larsen R.L., Hughes J.E., Welker D.L., De Carvalho V.G., Tompkins T.A., Ardö Y., Vogensen F., De Lorentiis A., Gatti M., Neviani E. et Steele J.L.** (2011). Genetic diversity in proteolytic enzymes and amino acid metabolism among *Lactobacillus helveticus* strains, *Journal of Dairy Science*, 94, 9, p.4313-4328.
- Bruinenberg P., Doesburg P., Alting A., Exterkate F., Devos W. et Siezen R.** (1994). Evidence for a large dispensable segment in the subtilisin-like catalytic domain of the *Lactococcus lactis* cell-envelope proteinase, *Protein Engineering*, 7, 8, p.991-996.
- Buist G., Kok J., Leenhouts K., Dabrowska M., Venema G. et Haandrikman A.** (1995). Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the major peptidoglycan hydrolase of *Lactococcus lactis*, a muramidase needed for cell separation, *Journal of Bacteriology*, 177, 6, p.1554-1563.
- Caira S., Ferranti P., Gatti M., Fornasari M.E., Barone F., Lilla S., Mucchetti G., Picariello G., Chianese L., Neviani E. et Addeo F.** (2003). Synthetic peptides as substrate for assaying the proteolytic activity of *Lactobacillus helveticus*, *The Journal of Dairy Research*, 70, 3, p.315-325.
- Callanan M., Kaleta P., O'Callaghan J., O'Sullivan O., Jordan K., McAuliffe O., Sangrador-Vegas A., Slattery L., Fitzgerald G.F., Beresford T. et Ross R.P.** (2008). Genome sequence of *Lactobacillus helveticus*, an organism distinguished by selective gene loss and insertion sequence element expansion, *Journal of Bacteriology*, 190, 2, p.727-735.

- Callebaut I., Labesse G., Durand P., Poupon A., Canard L., Chomilier J., Henrissat B. et Mornon J.P.** (1997a). Deciphering protein sequence information through hydrophobic cluster analysis (HCA): current status and perspectives, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 53, **8**, p.621-645.
- Callebaut I., Courvalin J.C., Worman H.J. et Mornon J.P.** (1997b). Hydrophobic cluster analysis reveals a third chromodomain in the Tetrahymena Pdd1p protein of the chromo superfamily, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 235, **1**, p.103-107.
- Carlsson F., Stalhammar-Carlemalm M., Flardh K., Sandin C., Carlemalm E. et Lindahl G.** (2006). Signal sequence directs localized secretion of bacterial surface proteins, *Nature*, 442, **7105**, p.943-946.
- Chang O.K., Perrin C., Galia W., Saulnier F., Miclo L., Roux E., Driou A., Humbert G. et Dary A.** (2012). Release of the cell-envelope protease PrtS in the growth medium of *Streptococcus thermophilus* 4F44, *International Dairy Journal*, 23, **2**, p.91-98.
- Chen I. et Dubnau D.** (2004). DNA uptake during bacterial transformation, *Nature Reviews Microbiology*, 2, **3**, p.241-249.
- Chou P.Y. et Fasman G.D.** (1974a). Conformational parameters for amino acids in helical, beta-sheet, and random coil regions calculated from proteins, *Biochemistry*, 13, **2**, p.211-222.
- Chou P.Y. et Fasman G.D.** (1974b). Prediction of protein conformation, *Biochemistry*, 13, **2**, p.222-245.
- Christensen J.E. et Steele J.L.** (2003). Impaired growth rates in milk of *Lactobacillus helveticus* peptidase mutants can be overcome by use of amino acid supplements, *Journal of bacteriology*, 185, **11**, p.3297-3306.
- Christiansen J.K., Hughes J.E., Welker D.L., Rodriguez B.T., Steele J.L. et Broadbent J.R.** (2008). Phenotypic and genotypic analysis of amino acid auxotrophy in *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32, *Applied and Environmental Microbiology*, 74, **2**, p.416-423.
- Claverys J.-P., Prudhomme M. et Martin B.** (2006). Induction of competence regulons as a general response to stress in gram-positive bacteria, in *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto, Annual Reviews, p.451-475.
- CNIEL.** Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière. <http://www.maison-du-lait.com/fr/filiere-laitiere-francaise-en-50-chiffres>.
- Dandoy D., Fremaux C., De Frahan M.H., Horvath P., Boyaval P., Hols P. et Fontaine L.** (2011). The fast milk acidifying phenotype of *Streptococcus thermophilus* can be acquired by natural transformation of the genomic island encoding the cell-envelope proteinase PrtS, *Microbial Cell Factories*, 10. Consultable à WOS:000303913600021.
- DeDent A., Bae T., Missiakas D.M. et Schneewind O.** (2008). Signal peptides direct surface proteins to two distinct envelope locations of *Staphylococcus aureus*, *Embo Journal*, 27, **20**, p.2656-2668.

Références bibliographiques

- Delcour J., Ferain T., Deghorain M., Palumbo E. et Hols P.** (1999). The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria, *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 76, 1-4, p.159-184.
- Delorme C., Bartholini C., Bolotine A., Ehrlich S.D. et Renault P.** (2010). Emergence of a cell wall protease in the *Streptococcus thermophilus* population, *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 2, p.451-460.
- Deutsch S.M., Ferain T., Delcour J. et Lortal S.** (2002). Lysis of lysogenic strains of *Lactobacillus helveticus* in Swiss cheeses and first evidence of concomitant *Streptococcus thermophilus* lysis, *International Dairy Journal*, 12, 7, p.591-600.
- Deveau H., Barrangou R., Garneau J.E., Labonte J., Fremaux C., Boyaval P., Romero D.A., Horvath P. et Moineau S.** (2008). Phage response to CRISPR-Encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*, *Journal of Bacteriology*, 190, 4, p.1390-1400.
- Doeven M.K., Abele R., Tampé R. et Poolman B.** (2004). The Binding Specificity of OppA Determines the Selectivity of the Oligopeptide ATP-binding Cassette Transporter, *Journal of Biological Chemistry*, 279, 31, p.32301-32307.
- Drake M.A., Boylston T.D., Spence K.D. et Swanson B.G.** (1996). Chemical and sensory effects of a *Lactobacillus* adjunct in Cheddar cheese, *Food Research International*, 29, 3-4, p.381-387.
- Drider D. et Prévost H.** (2009). *Bactéries lactiques: physiologie, métabolisme, génomique et applications industrielles*, Paris, France, Economica, 2009, 593 p.
- Drouault S., Anba J., Bonneau S., Bolotin A., Ehrlich S.D. et Renault P.** (2002). The peptidyl-prolyl isomerase motif is lacking in PmpA, the PrsA-like protein involved in the secretion machinery of *Lactococcus lactis*, *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 8, p.3932-3942.
- Dunten P. et Mowbray S.** (1995). Crystal structure of the dipeptide binding protein from *Escherichia coli* involved in active transport and chemotaxis, *Protein Science*, 4, 11, p.2327-2334.
- EFSA Journal**, (2010). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to live yoghurt cultures and improved lactose digestion (ID 1143, 2976) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006, 8:1763.
- Exterkate F.A.** (1984). Location of Peptidases Outside and Inside the Membrane of *Streptococcus cremoris*, *Applied and environmental microbiology*, 47, 1, p.177-183.
- Exterkate F.A.** (1995). The lactococcal cell envelope proteinases: Differences, calcium-binding effects and role in cheese ripening, *International Dairy Journal*, 5, 8, p.995-1018.
- Exterkate F.A., Altling A.C. et Bruinenberg P.G.** (1993). Diversity of cell envelope proteinase specificity among strains of *Lactococcus lactis* and its relationship to charge characteristics of the substrate-binding region, *Applied and environmental microbiology*, 59, 11, p.3640-3647.

Références bibliographiques

- Ezzat N., El Soda M., Bouillanne C., Zevaco C. et Blanchard P.** (1985). Cell wall associated proteinases in *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus lactis*, *Milchwissenschaft*, 40, 3, p.140-143.
- Fekkes P. et Driessen A.J.M.** (1999). Protein Targeting to the Bacterial Cytoplasmic Membrane, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63, 1, p.161-173.
- Fernandez-Espla M.D., Garault P., Monnet V. et Rul F.** (2000). *Streptococcus thermophilus* cell wall-anchored proteinase: release, purification and biochemical and genetic characterization, *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 11, p.4772-4778.
- Fischetti V.A., Pancholi V. et Schneewind O.** (1990). Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from gram-positive cocci, *Molecular Microbiology*, 4, 9, p.1603-1605.
- Fontaine L., Boutry C., De Frahan M.H., Delplace B., Fremaux C., Horvath P., Boyaval P. et Hols P.** (2010a). A novel pheromone quorum-sensing system controls the development of natural competence in *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*, *The Journal of Bacteriology*, 192, 5, p.1444-1454.
- Fontaine L., Dandoy D., Boutry C., Delplace B., De Frahan M.H., Fremaux C., Horvath P., Boyaval P. et Hols P.** (2010b). Development of a versatile procedure based on natural transformation for marker-free targeted genetic modification in *Streptococcus thermophilus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 23, p.7870-7877.
- Fontaine L., Goffin P., Dubout H., Delplace B., Baulard A., Lecat-Guillet N., Chambellon E., Gardan R. et Hols P.** (2013). Mechanism of competence activation by the ComRS signalling system in streptococci, *Molecular Microbiology*, 87, 6, p.1113-1132.
- Foucaud C., Kunji E.R., Hagting A., Richard J., Konings W.N., Desmazeaud M. et Poolman B.** (1995). Specificity of peptide transport systems in *Lactococcus lactis*: evidence for a third system which transports hydrophobic di- and tripeptides., *Journal of Bacteriology*, 177, 16, p.4652-4657.
- Galia W.** (2011). *Caractérisation de la variabilité du système protéolytique de surface de la bactérie lactique Streptococcus thermophilus*, Vandoeuvre-les-Nancy, INPL Consultable à <http://www.theses.fr/2011INPL053N>.
- Galia W., Perrin C., Genay M. et Dary A.** (2009). Variability and molecular typing of *Streptococcus thermophilus* strains displaying different proteolytic and acidifying properties, *International Dairy Journal*, 19, 2, p.89-95.
- Garault P., Le Bars D., Besset C. et Monnet V.** (2002). Three oligopeptide-binding proteins are involved in the oligopeptide transport of *Streptococcus thermophilus*, *Journal of Biological Chemistry*, 277, 1, p.32-39.
- Garnier J., Gibrat J.F. et Robson B.** (1996). GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence, *Methods in Enzymology*, 266, p.540-553.
- Geis A., Bockelmann W. et Teuber M.** (1985). Simultaneous extraction and purification of a cell wall-associated peptidase and β -casein specific protease from *Streptococcus cremoris* AC1, *Applied microbiology and biotechnology*, 23, 1, p.79-84.

Références bibliographiques

- Genay M., Sadat L., Gagnaire V. et Lortal S.** (2009). *prtH2*, not *prtH*, is the ubiquitous cell-wall proteinase gene in *Lactobacillus helveticus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 10, p.3238-3249.
- Germond J.-E., Delley M., Gilbert C. et Atlan D.** (2003). Determination of the domain of the *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* cell surface proteinase PrtB involved in attachment to the cell wall after heterologous expression of the *prtB* gene in *Lactococcus lactis*, *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 6, p.3377-3384.
- Gilbert C., Atlan D., Blanc B., Portalier R., Germond J.E., Lapierre L. et Mollet B.** (1996). A new cell surface proteinase: Sequencing and analysis of the *prtB* gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*, *Journal of Bacteriology*, 178, 11, p.3059-3065.
- Gilbert C., Blanc B., FrotCoutaz J., Portalier R. et Atlan D.** (1997). Comparison of cell surface proteinase activities within the *Lactobacillus* genus, *Journal of Dairy Research*, 64, 4, p.561-571.
- Gobbetti M., Di Cagno R. et De Angelis M.** (2010). Functional Microorganisms for Functional Food Quality, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50, 8, p.716-727.
- Goh Y.J., Goin C., O'Flaherty S., Altermann E. et Hutkins R.** (2011). Specialized adaptation of a lactic acid bacterium to the milk environment: the comparative genomics of *Streptococcus thermophilus* LMD-9, *Microbial Cell Factories*, 10. Consultable à WOS:000303913600022.
- Goldstein J.M., Banbula A., Kordula T., Mayo J.A. et Travis J.** (2001). Novel extracellular x-prolyl dipeptidyl-peptidase (DPP) from *Streptococcus gordonii* FSS2: an emerging subfamily of viridans streptococcal x-prolyl DPPs, *Infection and Immunity*, 69, 9, p.5494-5501.
- Griffiths M.W. et Tellez A.M.** (2013). *Lactobacillus helveticus*: the proteolytic system, *Frontiers in Microbiology*, 4, p.30.
- Guyer C.A., Morgan D.G. et Staros J.V.** (1986). Binding specificity of the periplasmic oligopeptide-binding protein from *Escherichia coli*., *Journal of Bacteriology*, 168, 2, p.775-779.
- Haandrikman A., Kok J. et Venema G.** (1991). Lactococcal proteinase maturation protein PrtM is a lipoprotein, *Journal of Bacteriology*, 173, 14, p.4517-4525.
- Hafeez Z.** (2013). *Streptococcus thermophilus* et *Lactococcus lactis* : des bactéries lactiques comme outils de production de peptides bioactifs ? : Impact du système protéolytique sur la stabilité des peptides et production hétérologue d'un peptide anxiolytique, l'[alpha]-casozépine
- Hafeez Z., Cakir-Kiefer C., Girardet J.-M., Jardin J., Perrin C., Dary A. et Miclo L.** (2013). Hydrolysis of milk-derived bioactive peptides by cell-associated extracellular peptidases of *Streptococcus thermophilus*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 22, p.9787-9799.
- Håvarstein L.S.** (2010). Increasing competence in the genus *Streptococcus*, *Molecular Microbiology*, 78, 3, p.541-544.

Hayes M., Stanton C., Slattery H., O'Sullivan O., Hill C., Fitzgerald G.F. et Ross R.P. (2007). Casein fermentate of *Lactobacillus animalis* DPC6134 contains a range of novel propeptide angiotensin-converting enzyme inhibitors, *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 14, p.4658-4667.

Hebert E.M., Mamone G., Picariello G., Raya R.R., Savoy G., Ferranti P. et Addeo F. (2008). Characterization of the pattern of alpha(s1)- 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, 12, p.3682-3689.

Hebert E.M., Raya R.R. et De Giori G.S. (2002). Modulation of the cell-surface proteinase activity of thermophilic lactobacilli by the peptide supply, *Current Microbiology*, 45, 6, p.385-389.

Hebert E.M., Raya R.R. et De Giori G.S. (2000). Nutritional requirements and nitrogen-dependent regulation of proteinase activity of *Lactobacillus helveticus* CRL 1062, *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 12, p.5316-5321.

Hols P., Hancy F., Fontaine L., Grossiord B., Prozzi D., Leblond-Bourget N., Decaris B., Bolotin A., Delorme C., Ehrlich S.D., Guedon E., Monnet W., Renault P. et Kleerebezem M. (2005). New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics, *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 3, p.435-463.

Horvath P., Romero D.A., Coûté-Monvoisin A.-C., Richards M., Deveau H., Moineau S., Boyaval P., Fremaux C. et Barrangou R. (2008). Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*, *Journal of bacteriology*, 190, 4, p.1401-1412.

Hu S., Kong J., Sun Z., Han L., Kong W. et Yang P. (2011). Heterologous protein display on the cell surface of lactic acid bacteria mediated by the S-layer protein, *Microb Cell Fact*, 10, p.86.

Hutchings M.I., Palmer T., Harrington D.J. et Sutcliffe I.C. (2009). Lipoprotein biogenesis in Gram-positive bacteria: knowing when to hold 'em, knowing when to fold 'em, *Trends in Microbiology*, 17, 1, p.13-21.

Jameh N. (2012). *Système protéolytique de surface de Streptococcus thermophilus : variabilité des capacités d'hydrolyse des caséines : caractérisation d'un nouveau système de transport de peptides*, Université de Lorraine, 2012 Consultable à <http://www.theses.fr/2012LORR0197>.

Jenkinson H.F., Baker R.A. et Tannock G.W. (1996). A binding-lipoprotein-dependent oligopeptide transport system in *Streptococcus gordonii* essential for uptake of hexa- and heptapeptides, *Journal of Bacteriology*, 178, 1, p.68-77.

Jensen M.P., Vogensen F.K. et Ardo Y. (2009). Variation in caseinolytic properties of six cheese related *Lactobacillus helveticus* strains, *International Dairy Journal*, 19, 11, p.661-668.

Johnsborg O., Eldholm V. et Havarstein L.S. (2007). Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function, *Research in Microbiology*, 158, 10, p.767-778.

Références bibliographiques

- Johnson B., Selle K., O'Flaherty S., Goh Y.J. et Klaenhammer T.** (2013). Identification of extracellular surface-layer associated proteins in *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Microbiology-Sgm*, 159, p.2269-2282.
- Johnston C., Martin B., Fichant G., Polard P. et Claverys J.-P.** (2014). Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control, *Nature Reviews Microbiology*, 12, 3, p.181-196.
- Juille O., Le Bars D. et Juillard V.** (2005). The specificity of oligopeptide transport by *Streptococcus thermophilus* resembles that of *Lactococcus lactis* and not that of pathogenic streptococci, *Microbiology-Sgm*, 151, p.1987-1994.
- Junjua M.** (2013). *Exploration du potentiel probiotique de la bactérie lactique Streptococcus thermophilus : évaluation du potentiel probiotique et de sa variabilité : mise au point et validation de l'outil R-IVET (Recombinase based in vivo Expression Technology) pour l'étude de l'état physiologique de la bactérie dans le tractus gastro-intestinal* Consultable à <http://www.theses.fr/2013LORR0034/document>.
- Koide A. et Hoch J.** (1994). Identification of a 2nd oligopeptide transport system in *Bacillus subtilis* and determination of its role in sporulation, *Molecular Microbiology*, 13, 3, p.417-426.
- Korhonen H.** (2009). Milk-derived bioactive peptides: From science to applications, *Journal of Functional Foods*, 1, 2, p.177-187.
- Kunji E.R.S., Mierau I., Hagting A., Poolman B. et Konings W.N.** (1996). The proteolytic systems of lactic acid bacteria, *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 70, 2-4, p.187-221.
- Laffineur E., Genetet N. et Leonil J.** (1996). Immunomodulatory activity of beta-casein permeate medium fermented by lactic acid bacteria, *Journal of Dairy Science*, 79, 12, p.2112-2120.
- Laloi P., Atlan D., Blanc B., Gilbert C. et Portalier R.** (1991). Cell-wall-associated proteinase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNRZ 397: differential extraction, purification and properties of the enzyme., *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36, 2, p.196-204.
- Lamarque M., Charbonnel P., Aubel D., Piard J.-C., Atlan D. et Juillard V.** (2004). A Multifunction ABC Transporter (Opt) Contributes to Diversity of Peptide Uptake Specificity within the Genus *Lactococcus*, *Journal of Bacteriology*, 186, 19, p.6492-6500.
- De LeBlanc A.D., Matar C., Theriault C. et Perdigon G.** (2005). Effects of milk fermented by *Lactobacillus helveticus* R389 on immune cells associated to mammary glands in normal and a breast cancer model, *Immunobiology*, 210, 5, p.349-358.
- LeBlanc J.G., Matar C., Valdez J.C., LeBlanc J. et Perdigon G.** (2002). Immunomodulating effects of peptidic fractions issued from milk fermented with *Lactobacillus helveticus*, *Journal of Dairy Science*, 85, 11, p.2733-2742.
- Lee H.C. et Bernstein H.D.** (2001). The targeting pathway of *Escherichia coli* presecretory and integral membrane proteins is specified by the hydrophobicity of the targeting signal,

Références bibliographiques

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98, 6, p.3471-3476.

Leenhouts K., Buist G. et Kok J. (1999). Anchoring of proteins to lactic acid bacteria, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76, 1-4, p.367-376.

Lemieux L. et Simard R. (1992). Bitter flavour in dairy products. II. A review of bitter peptides from caseins: their formation, isolation and identification, structure masking and inhibition, *Lait*, 72, 4, p.335-382.

Letort C. et Juillard V. (2001). Development of a minimal chemically-defined medium for the exponential growth of *Streptococcus thermophilus*, *Journal of Applied Microbiology*, 91, 6, p.1023-1029.

Levdikov V.M., Blagova E.V., Brannigan J.A., Wright L., Vagin A.A. et Wilkinson A.J. (2005). The structure of the oligopeptide-binding protein, AppA, from *Bacillus subtilis* in complex with a nonapeptide, *Journal of Molecular Biology*, 345, 4, p.879-892.

Le Loir Y., Azevedo V., Oliveira S.C., Freitas D.A., Miyoshi A., Bermudez-Humaran L.G., Nouaille S., Ribeiro L.A., Leclercq S., Gabriel J.E., Guimaraes V.D., Oliveira M.N., Charlier C., Gautier M. et Langella P. (2005). Protein secretion in *Lactococcus lactis*: an efficient way to increase the overall heterologous protein production, *Microbial Cell Factories*, 4. Consultable à WOS:000232537500002.

Lortal S. et Chapot-Chartier M.-P. (2005). Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese, *The Fourth IDF Symposium on Cheese: Ripening, Characterization and Technology*, 15, 6-9, p.857-871.

Lortal S., Rousseau M., Boyaval P. et Heijenoort J.V. (1991). Cell wall and autolytic system of *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046, *Journal of General Microbiology*, 137, 3, p.549-559.

Lortal S., Van Heijenoort J., Gruber K. et Sleytr U.B. (1992). S-layer of *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046: isolation, chemical characterization and re-formation after extraction with lithium chloride, *Journal of general microbiology*, 138, 3, p.611-618.

Marraffini L.A., DeDent A.C. et Schneewind O. (2006). Sortases and the Art of Anchoring Proteins to the Envelopes of Gram-Positive Bacteria, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70, 1, p.192-221.

Martin B., Soulet A.-L., Mirouze N., Prudhomme M., Mortier-Barrière I., Granadel C., Noirot-Gros M.-F., Noirot P., Polard P. et Claverys J.-P. (2013). ComE/ComE~P interplay dictates activation or extinction status of pneumococcal X-state (competence), *Molecular microbiology*, 87, 2, p.394-411.

Martin-Hernandez M., Alting A. et Exterkate F. (1994). Purification and characterization of the mature, membrane-associated cell-envelope proteinase of *Lactobacillus helveticus* L89, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40, 6, p.828-834.

Mashburn-Warren L., Morrison D. et Federle M. (2010). A novel double-tryptophan peptide pheromone controls competence in *Streptococcus* spp. via an Rgg regulator., *Molecular microbiology*, 78, 3, p.589-606.

- Masuda K. et Kawata T.** (1983). Distribution and chemical characterization of regular arrays in the cell walls of strains of the genus *Lactobacillus*, *FEMS Microbiology Letters*, 20, 2, p.145-150.
- Matar C., Valdez J.C., Medina M., Rachid M. et Perdigon G.** (2001). Immunomodulating effects of milks fermented by *Lactobacillus helveticus* and its non-proteolytic variant, *Journal of Dairy Research*, 68, 4, p.601-609.
- Miclo L., Roux E., Genay M., Brusseau E., Poirson C., Jameh N., Perrin C. et Dary A.** (2012). Variability of hydrolysis of β -, α s1-, and α s2 caseins by 10 strains of *Streptococcus thermophilus* and resulting bioactive peptides, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 2, p.554-565.
- Minervini F., Algaron F., Rizzello C.G., Fox P.F., Monnet V. et Gobbetti A.** (2003). Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species, *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 9, p.5297-5305.
- Miyakawa H., Kobayashi S., Shimamura S. et Tomita M.** (1992). Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus helveticus* LHE-511, *Journal of Dairy Science*, 75, 1, p.27-35.
- Muller J.P., Ozegowski J., Vettermann S., Swaving J., Van Wely K.H.M. et Driessen A.J.M.** (2000). Interaction of *Bacillus subtilis* CsaA with SecA and precursor proteins, *Biochemical Journal*, 348, p.367-373.
- Mulvihill D.M. et Fox P.F.** (1978). Proteolysis of Bovine β -Casein by Chymosin: Influence of pH, Urea and Sodium Chloride, *Irish Journal of Food Science and Technology*, 2, 2, p.135-139.
- Navarre W.W. et Schneewind O.** (1999). Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope, *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 63, 1, p.174-229.
- Neuhaus F.C. et Baddiley J.** (2003). A Continuum of Anionic Charge: Structures and Functions of D-Alanyl-Teichoic Acids in Gram-Positive Bacteria, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67, 4, p.686-723.
- Nickitenko A.V., Trakhanov S. et Quioco F.A.** (1995). 2 angstrom resolution structure of DppA, a periplasmic dipeptide transport chemosensory receptor, *Biochemistry*, 34, 51, p.16585-16595.
- Oberg C.J., Broadbent J.R., Strickland M. et McMahon D.J.** (2002). Diversity in specificity of the extracellular proteinases in *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*, *Letters in Applied Microbiology*, 34, 6, p.455-460.
- Olson N.F., Gunasekaran S. et Bogenrief D.D.** (1996). Chemical and physical properties of cheese and their interactions, *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 50, 2, p.279-294.
- Ono H., Yamamoto N., Maeno M., Takano T. et Momose H.** (1997). Purification and characterization of a cell-wall associated proteinase of *Lactobacillus helveticus* CP53, *Milchwissenschaft-Milk Science International*, 52, 7, p.373-377.

- Oommen B.S., McMahon D.J., Oberg C.J., Broadbent J.R. et Strickland M.** (2002). Proteolytic specificity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* influences functional properties of mozzarella cheese, *Journal of Dairy Science*, 85, **11**, p.2750-2758.
- Pastar I., Tonic I., Golic N., Kojic M., Van Kranenburg R., Kleerebezem M., Topisirovic L. et Jovanovic G.** (2003). Identification and genetic characterization of a novel proteinase, PrtR, from the human isolate *Lactobacillus rhamnosus* BGT10, *Applied and Environmental Microbiology*, 69, **10**, p.5802-5811.
- Pederson J.A., Mileski G.J., Weimer B.C. et Steele J.L.** (1999). Genetic characterization of a cell envelope-associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32, *Journal of Bacteriology*, 181, **15**, p.4592-4597.
- Petersen T.N., Brunak S., Von Heijne G. et Nielsen H.** (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions, *Nature Methods*, 8, **10**, p.785-786.
- Petit C.M., Brown J.R., Ingraham K., Bryant A.P. et Holmes D.J.** (2001). Lipid modification of prelipoproteins is dispensable for growth in vitro but essential for virulence in *Streptococcus pneumoniae*, *FEMS Microbiology Letters*, 200, **2**, p.229-233.
- Picon A. et Van Wely K.H.M.** (2001). Peptide Binding to the *Bacillus subtilis* Oligopeptide-Binding Proteins OppA and AppA, *Molecular Biology Today*, 2, p.21-25.
- Podbielski A. et Leonard B.A.B.** (1998). The group A streptococcal dipeptide permease (Dpp) is involved in the uptake of essential amino acids and affects the expression of cysteine protease, *Molecular Microbiology*, 28, **6**, p.1323-1334.
- Pritchard G. et Coolbear T.** (1993). The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria, *Fems Microbiology Reviews*, 12, **1-3**, p.179-206.
- Rasmussen T.B., Danielsen M., Valina O., Garrigues C., Johansen E. et Pedersen M.B.** (2008). *Streptococcus thermophilus* core genome: Comparative genome hybridization study of 47 Strains, *Applied and Environmental Microbiology*, 74, **15**, p.4703-4710.
- Reid J.R., Ng K.H., Moore C.H., Coolbear T. et Pritchard G.G.** (1991). Comparison of bovine beta-casein hydrolysis by PI and PIII-type proteinases from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36, **3**, p.344-351.
- Sadat-Mekmene L., Richoux R., Aubert-Frogerais L., Madec M.-N., Corre C., Piot M., Jardin J., Le Feunteun S., Lortal S. et Gagnaire V.** (2013). *Lactobacillus helveticus* as a tool to change proteolysis and functionality in Swiss-type cheeses, *Journal of Dairy Science*, 96, **3**, p.1455-1470.
- Sadat-Mekmene L., Genay M., Atlan D., Lortal S. et Gagnaire V.** (2011a). Original features of cell-envelope proteinases of *Lactobacillus helveticus*. A review, *International Journal of Food Microbiology*, 146, **1**, p.1-13.
- Sadat-Mekmene L., Jardin J., Corre C., Molle D., Richoux R., Delage M.M., Lortal S. et Gagnaire V.** (2011b). Simultaneous presence of PrtH and PrtH2 proteinases in *Lactobacillus helveticus* strains improves breakdown of the pure alpha(s1)-casein, *Applied and Environmental Microbiology*, 77, **1**, p.179-186.

Références bibliographiques

- Samen U., Gottschalk B., Eikmanns B.J. et Reinscheid D.J.** (2004). Relevance of Peptide Uptake Systems to the Physiology and Virulence of *Streptococcus agalactiae*, *Journal of Bacteriology*, 186, **5**, p.1398-1408.
- Sára M., Moser-Thier K., Kainz U. et Sleytr U.** (1990). Characterization of S-layers from mesophilic bacillaceae and studies on their protective role towards muramidases, *Archives of Microbiology*, 153, **3**, p.209-214.
- Savijoki K., Ingmer H. et Varmanen P.** (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, **4**, p.394-406.
- Schleifer K.H. et Kandler O.** (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications, *Bacteriological Reviews*, 36, **4**, p.407-477.
- Schneewind O. et Missiakas D.M.** (2012). Protein secretion and surface display in Gram-positive bacteria, *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 367, **1592**, p.1123-1139.
- Schneewind O., Mihaylova-Petkov D. et Model P.** (1993). Cell wall sorting signals in surface proteins of gram-positive bacteria, *The EMBO journal*, 12, **12**, p.4803-4811.
- Scolari G., Vescovo M., Zacconi C. et Vescovi F.** (2006). Extraction and partial characterization of proteolytic activities from the cell surface of *Lactobacillus helveticus* Zuc2, *Journal of Dairy Science*, 89, **10**, p.3800-3809.
- Shahbal S., Hemme D. et 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, **3**, p.351-357.
- Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J. et Higgins D.** (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega., *Molecular systems biology*, 7, p.539.
- Siezen R.J.** (1999). Multi-domain, cell-envelope proteinases of lactic acid bacteria, *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 76, **1-4**, p.139-155.
- Siezen R.J. et Leunissen J.A.M.** (1997). Subtilases: The superfamily of subtilisin-like serine proteases, *Protein Science*, 6, **3**, p.501-523.
- Sleytr U.B. et Beveridge T.J.** (1999). Bacterial S-layers, *Trends in Microbiology*, 7, **6**, p.253-260.
- Smeianov V.V., Wechter P., Broadbent J.R., Hughes J.E., Rodriguez B.T., Christensen T.K., Ardo Y. et Steele J.L.** (2007). Comparative high-density microarray analysis of gene expression during growth of *Lactobacillus helveticus* in milk versus rich culture medium, *Applied and Environmental Microbiology*, 73, **8**, p.2661-2672.
- Smitha R.C. et Anne J.** (2011). Bacterial type I signal peptidases as antibiotic targets, *Future Microbiology*, 6, **11**, p.1279-1296.

- Soeryapranata E., Powers J.R. et Unlu G.** (2007). Cloning and characterization of debittering peptidases, PepE, PepO, PepO2, PepO3, and PepN, of *Lactobacillus helveticus* WSU19, *International Dairy Journal*, 17, 9, p.1096-1106.
- Sun Z., Chen X., Wang J., Zhao W., Shao Y., Wu L., Zhou Z., Sun T., Wang L., Meng H., Zhang H. et Chen W.** (2011). Complete genome sequence of *Streptococcus thermophilus* strain ND03, *Journal of Bacteriology*, 193, 3, p.793-794.
- Taylor D.L., Ward P.N., Rapier C.D., Leigh J.A. et Bowler L.D.** (2003). Identification of a differentially expressed oligopeptide binding protein (OppA2) in *Streptococcus uberis* by representational difference analysis of cDNA, *Journal of Bacteriology*, 185, 17, p.5210-5219.
- Tsakalidou E., Anastasiou R., Vandenberghe I., Van Beeumen J. et 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, 5, p.2035-2040.
- Vandamme P., Pot B., Gillis M., De Vos P., Kersters K. et Swings J.** (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics, *Microbiological reviews*, 60, 2, p.407-438.
- Verheul A., Rombouts F.M. et Abee T.** (1998). Utilization of oligopeptides by *Listeria monocytogenes* Scott A, *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3, p.1059-1065.
- Vickerman M.M., Iobst S., Jesionowski A.A. et Gill S.R.** (2007). Genome-wide transcriptional changes in *Streptococcus gordonii* in response to competence signaling peptide, *Journal of Bacteriology*, 189, 21, p.7799-7807.
- Visser S.** (1993). Symposium - Proteolytic-Enzymes and cheese ripening - Proteolytic-Enzymes and their relation to cheese ripening and flavor - An overview, *Journal of Dairy Science*, 76, 1, p.329-350.
- Visser S., Exterkate F.A., Slangen C.J. et De Veer G.J.** (1986). Comparative study of action of cell wall proteinases from various strains of *Streptococcus cremoris* on bovine alpha(s1)-, beta-, and kappa-casein, *Applied and environmental microbiology*, 52, 5, p.1162-1166.
- Visser S., Robben A.J. et Slangen C.J.** (1991). Specificity of a cell-envelope-located proteinase (PIII-type) from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM1 in its action on bovine beta-casein, *Applied microbiology and biotechnology*, 35, 4, p.477-483.
- Vos P., Boerrigter I., Buist G., Haandrikman A., Nijhuis M., Dereuver M., Siezen R., Venema G., Devos W. et Kok J.** (1991). Engineering of the *Lactococcus lactis* serine proteinase by construction of hybrid enzymes, *Protein Engineering*, 4, 4, p.479-484.
- Vos P., Simons G., Siezen R.J. et De Vos W.M.** (1989). Primary structure and organization of the gene for a procaryotic, cell envelope-located serine proteinase, *The Journal of biological chemistry*, 264, 23, p.13579-13585.
- Wasko A., Polak-Berecka M., Kuzdralski A. et Skrzypek T.** (2014). Variability of S-layer proteins in *Lactobacillus helveticus* strains, *Anaerobe*, 25, p.53-60.

Références bibliographiques

Woodcock S., Mornon J.P. et Henrissat B. (1992). Detection of secondary structure elements in proteins by hydrophobic cluster analysis, *Protein Engineering*, 5, 7, p.629-635.

Yamamoto N., Akino A. et Takano T. (1994). Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790, *Journal of Dairy Science*, 77, 4, p.917-922.

Yamamoto N., Akino A. et Takano T. (1993). Purification and specificity of a cell-wall-associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790, *Journal of Biochemistry*, 114, 5, p.740-745.

Yu W. et Gotz F. (2012). Cell wall antibiotics provoke accumulation of anchored mCherry in the cross wall of *Staphylococcus aureus*, *Plos One*, 7, 1, p.384-392.

Zevaco C. et Gripon J.C. (1988). Properties and specificity of a cell-wall proteinase from *Lactobacillus helveticus*, *Le Lait*, 68, 4, p.393-408.

Zhou M.M., Theunissen D., Wels M. et Siezen R.J. (2010). LAB-Secretome: a genome-scale comparative analysis of the predicted extracellular and surface-associated proteins of Lactic Acid Bacteria, *BMC Genomics*, 11. Consultable à WOS:000285385400002.

Annexe

***Streptococcus thermophilus*, un outil d'expression hétérologue émergeant et prometteur : avantages et futures applications**

**Xavier LECOMTE, Valérie GAGNAIRE, Sylvie LORTAL, Annie DARY and
Magali GENAY.**

**Soumis en Juin 2014,
dans le projet d'une édition spéciale du journal Food Microbiology faisant suite à un
présentation orale lors de la conférence du CBL (club des Bactéries Lactiques) en
Octobre 2013.**

Résumé :

Streptococcus thermophilus est la deuxième espèce bactérienne la plus utilisée dans l'industrie laitière. Il est quotidiennement consommé par des millions de personnes dans mondiale via la consommation de yaourts, de fromages et de laits fermentés. *S. thermophilus* présente des caractéristiques qui font de lui un bon candidat à la production de protéines hétérologues. D'abord, sa capacité d'être naturellement transformable permet d'obtenir rapidement et facilement des souches recombinantes en utilisant divers outils génétiques disponibles. Deuxièmement, son statut « GRAS » et sa capacité à produire des molécules bénéfiques ou de libérer des peptides bioactifs à partir de protéines du lait, ouvrent la voie vers le développement de nouveaux produits alimentaires fonctionnels axé sur la santé et le bien-être des consommateurs. Finalement, sa capacité de survivre au passage du tractus gastro-intestinal et d'y être métaboliquement active, permettent de considérer *S. thermophilus* comme un outil potentiel pour délivrer des diverses molécules biologiques dans le tractus gastro-intestinal.

Le but de cette revue est donc d'examiner les divers outils génétiques qui peuvent être employés chez *S. thermophilus* pour produire des protéines hétérologues et mettre en avant les avantages et les futures d'utilisations potentielles de cette bactérie en tant qu'hôte d'expression hétérologue.

Mots clés : *Streptococcus thermophilus*, Outils génétiques, Expression hétérologue, qualité alimentaire, compétence naturelle.

***Streptococcus thermophilus*, an emerging and promising tool for heterologous expression: advantages and future trends**

Xavier LECOMTE^{a,b,c,d}, Valérie GAGNAIRE^{c,d}, Sylvie LORTAL^{c,d}, Annie DARY^{a,b,‡} and Magali GENAY^{a,b,‡,*}.

^a *Université de Lorraine, Unité de Recherche Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux, Equipe Protéolyse et Biofonctionnalité des Protéines et des Peptides, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France.*

^b *INRA, UR AFPA Unité Sous Contrat 340, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France*

^c *UMR 1253, INRA, Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, Rennes, France.*

^d *UMR 1253, Agrocampus Ouest, Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, Rennes, France.*

[‡] *Co senior authors.*

^{*} *Corresponding author: Magali GENAY. Université de Lorraine, Unité de Recherche Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux, Equipe Protéolyse et Biofonctionnalité des Protéines et des Peptides, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France. Tel: +33 383684271. E-mail address: magali.genay@univ-lorraine.fr.*

Abstract

Streptococcus thermophilus is the second most used bacterium in dairy industry. It is daily consumed by millions of people through the worldwide consumption of yogurts, cheeses and fermented milks. *S. thermophilus* presents many features that make it a good candidate for the production of heterologous proteins. First, its ability to be naturally transformable allows obtaining swiftly and easily recombinant strains using various genetic tools available. Second, its Generally Recognised As Safe status and its ability to produce beneficial molecules or to liberate bioactive peptides from milk proteins open up the way for the development of new functional foods to maintain health and well-being of consumers. Finally, its ability to survive the intestinal passage and to be metabolically active in gastrointestinal tract allows

considering *S. thermophilus* as a potential tool for delivering various biological molecules to the gastrointestinal tract.

The aim of this review is therefore to take stock of various genetic tools which can be employed in *S. thermophilus* to produce heterologous proteins and to highlight the advantages and future trends of use of this bacterium as a heterologous expression host.

Highlights

We highlight the advantages of *S. thermophilus* as a heterologous expression host.

We update genetic tools available in *S. thermophilus*.

We insist on the food grade status of *S. thermophilus*.

Keywords

Streptococcus thermophilus, genetic tools, heterologous expression, food-grade, natural competence.

1. Introduction

From fundamental studies to industrial processes, synthesis of heterologous protein has become a precious tool for various studies such as determination of protein function, activity or interaction or to present protein or peptide for vaccination purposes. To successfully express a heterologous protein, the choice of the host is crucial. In prokaryotes, the most employed hosts are *Escherichia coli* for gram negative bacteria and *Bacillus subtilis* for gram positive bacteria. Unfortunately, these two model bacteria cannot be employed in all situations, especially in food industry, which has led to the development of tools usable in other bacteria such as lactic acid bacteria (LAB). Indeed, numerous LAB strains which are used in food processing like dairy and fermented meat products, have the Generally Recognised As Safe (GRAS) status provided by the U.S. Food and Drug Administration and fulfil the criteria of the Qualified Presumption of Safety (QPS) provided by the European Food Safety Authority (EFSA). In addition, some of them are considered as probiotic and able to survive in the gastrointestinal tract. It is even possible to encapsulate bacteria of interest to

increase their viability during passage through the gastrointestinal tract (Foligné et al., 2013). Hence, their use as vectors for delivering beneficial molecules in food, particularly in dairy products, or directly in the gastrointestinal tract is therefore possible. Even if using Genetically Modified organisms (GMO) for food processing is far from being accepted by European consumers, it opens doors to applications in the food industry but also for medical purposes in prevention or therapeutic treatments.

Among LAB, lactococci and lactobacilli are until now mostly studied, and several tools and strategies have been developed for heterologous expression, for example to deliver mucosal vectors for therapeutic proteins and DNA vaccines (for recent review see Bermúdez-Humarán et al., 2013). It is for example the case of *Lactococcus lactis* which displays a high capacity to be electrotransformed and an efficient protein secretion capability, explaining the design of many tools for genetic modifications. Recently, another lactic acid bacterium, *Streptococcus thermophilus*, emerged as a good host for heterologous expression thanks to its various advantages. *S. thermophilus* is widely used for its acidification ability in dairy industry for making different fermented food. It is mainly used in combination with lactobacilli for the production of processed cheeses, Mozzarella, or Swiss-type hard cooked cheeses and used as a co-starter with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in the manufacture of yogurt. *S. thermophilus* is also used alone to produce fermented milks, particularly with the aim to produce functional food. Indeed, *S. thermophilus* is able to produce biofunctional molecules, which will exert a positive effect on consumer health and thus allow prevention of certain pathologies (Miclo et al., 2012). A very important advantage regarding heterologous expression is that this lactic acid bacterium is now well-known to be naturally competent (Blomqvist et al., 2006a; Fontaine et al., 2010a). This ability to internalize foreign DNA constitutes an easy way to transform this species using its own DNA capture pathway to integrate single mutations in its genome or to introduce foreign genes present in a plasmid construction or directly into the chromosome (Fontaine et al., 2010b). Indeed, this method allows not only transforming *S. thermophilus* with classical plasmid vectors, but also with linear fragments that can directly be integrated into the chromosome if they are flanked by two 1 kilobase (kb) homologous DNA fragments corresponding to the upstream and downstream regions where the foreign DNA needs to be inserted (Blomqvist et al., 2006a; Fontaine et al., 2010b). Moreover, the use of linear fragments allows insertion of large DNA fragments up to 15 kb (Dandoy et al., 2011) which is a real challenge with plasmid vector. Therefore, this ability to be naturally transformed provides an advantage to *S. thermophilus* compared to *Lc. lactis* which still lacks natural transformation.

The aim of this review is to take stock of genetic tools (promoters, plasmids ...) available in *S. thermophilus* to produce heterologous proteins and to highlight the potential of this bacterium as a heterologous expression host.

2. Available tools for heterologous expression in *S. thermophilus*

The correct heterologous expression of a protein requires employing different tools specifically adapted to the host. They could be divided into four main categories: i) an adequate vector, ii) an appropriate promoter, iii) a selection marker to detect positive clones and optionally iv) tools for specific modifications of the heterologous gene such as sequence for secretion or anchoring domain. In the 1980s, the development of more rapid and convenient transformation techniques opened gates to heterologous expression in *S. thermophilus* leading to the characterization and production of various genetic tools (Kondo and McKay, 1984; Somkuti et al., 1988; O'Sullivan and Fitzgerald, 1999; Geis et al., 2003). More recently, the demonstration that *S. thermophilus* was naturally competent (Blomqvist et al., 2006a) provides new advantages for both the genetic manipulation of this bacterium and its use to synthesize heterologous proteins. Each of the four categories of tools required for this purpose will be developed below.

2.1. Available vectors

Despite the interest to directly insert DNA into the chromosome, which ensures a stable presence of the introduced gene in contrast to plasmids which are known to be genetically unstable elements, free plasmid vectors may remain attractive as the use of multiple copy vectors could increase amount of heterologous protein production. From 1980s, many vectors have been developed for *S. thermophilus* by modifying or fusing plasmids already developed in other models, to obtain special features. For example, shuttle vectors, replication thermosensitive plasmid or food-grade vectors have been devised (Table 1).

Table 1: Examples of plasmids used to transform *S. thermophilus* and their main features

Plasmid	Replicon (<i>selection gene</i>)	Size (kb)	Utilization	References
pER8		2.2	Cryptic plasmids of <i>S. thermophilus</i>	Somkuti and Steinberg, 1986
pER371		2.7		
pMEU5 and pMEU6	pER8 (<i>erm</i> , <i>bla</i>)	5.7	Shuttle vector for <i>E. coli</i> and <i>S. thermophilus</i> and other LAB	Solaiman and Somkuti, 1993
pMEU9 and pMEU10	pER8 (<i>erm</i> , <i>bla</i> , <i>cat</i>)	6.9		
pG+host9	pWV01 (Ts) (<i>erm</i>)	3.7	Thermosensitive vector for gene inactivation and random insertional mutagenesis	Maguin et al., 1996
p5aGFP2201a	pMEU5a + pUCP8201 (<i>bla</i> , <i>erm</i> , <i>gfp</i>)	6.4	Shuttle vector for <i>E. coli</i> , <i>S. thermophilus</i> and other LAB	Solaiman and Somkuti, 1997a
pMeu14'-1	pER371 + pUER28b (<i>bla</i> , <i>erm</i>)	5.3	Shuttle vector for <i>E. coli</i> and <i>S. thermophilus</i>	Solaiman and Somkuti, 1997b
pPC418	p5aGFP2201a (<i>erm</i> , <i>bla</i>)	7.9	Pediocin expression in LAB	Coderre and Somkuti, 1999
pPC318	p5aGFP2201a (<i>bla</i>)	9.1		
pG341a/b	pMEU5a (<i>bla</i> , <i>erm</i>)	6.4	Heterologous gene expression in <i>S. thermophilus</i> and <i>E. coli</i>	Somkuti and Steinberg, 1999
pSMQ172cat	pSMQ172 (<i>cat</i>)	5.7	Theta replication shuttle vector for <i>E. coli</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>S. salivarius</i> and <i>Lc. lactis</i>	Turgeon and Moineau, 2001
pHRM1	pSt08 (<i>shsp</i>)	6.4	Thermoresistance vector (<i>shsp</i>)	El Demerdash et al., 2003
pINTRS	pWV01 (Ts) (<i>erm</i>)	5.3	Food grade vector for chromosomal insertion of heterologous DNA or gene inactivation	Renye and Somkuti, 2009

List of abbreviations: small heat shock proteins gene (*shsp*), Thermosensitive replicon (Ts), erythromycin resistance gene (*erm*), green fluorescent protein gene (*gfp*), chloramphenicol acetyl transferase gene (*cat*) and ampicillin resistance gene (*bla*)

Thereby, Solaiman and Somkuti (1993) constructed a series of pMEU vectors and derivatives which were able to replicate in *E. coli*, *S. thermophilus*, and other LAB, like pG341Pa and pG341Pb in *Lc. lactis* (Somkuti and Steinberg, 1999). Such shuttle vectors are interesting because the appropriate construction can be achieved in *E. coli* which remains the best cloning host and can be recovered in large amount (Green and Sambrook, 2012). Furthermore, the use of the same vector in different LAB permits to easily test the host-dependent production of a heterologous protein. For example, the shuttle vectors pPC418 and pPC318 (Table 1) constructed to produce pediocin, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*, in *S. thermophilus* (Coderre and Somkuti, 1999) were isolated and purified from *E. coli* DH5 α and used to electrotransform *Lc. lactis* ssp. *lactis* ML-3, *S. thermophilus* ST128 and *Enterococcus faecalis* DL-3 (Somkuti and Steinberg, 2003). All these shuttle vectors have a rolling-circle replication. Plasmids with theta replication have been developed, as pSMQ172cat which replicates in both gram-positive and gram-negative bacteria (Turgeon and Moineau, 2001). The use of plasmids with different replication mechanism allows overcoming incompatibility issues when several plasmids should be introduced in the same host (Shareck et al., 2004).

Some plasmids containing a temperature sensitive origin of replication, as for example pG+host9 and pINTRS (Table 1), have been used to force DNA fragments to integrate into the chromosome, allowing efficient gene inactivation and direct cloning of DNA. This integration could occur either through homologous recombination or insertional mutagenesis events using transposons (Maguin et al., 1992; Maguin et al., 1996, Renye and Somkuti, 2009). Moreover, efficient excision of such vectors *via* a shift of temperature provides a stable food-grade mutant (Maguin et al., 1996; Renye and Somkuti, 2009).

Most of the time, these plasmids can be selected through the presence of an antibiotic resistance gene, incompatible with food-grade cloning systems, which require solely DNA from the homologous host or from another GRAS bacterium, and food-grade markers. For example, one way to design food-grade vectors is to use cryptic plasmids, which generally encode genes for which functions can be proposed but no phenotypes observed and to use some functions encoded by the cryptic plasmids itself as selectable markers (Shareck et al., 2004). Thus, plasmids containing a gene encoding small heat shocks proteins can be selected using elevated incubation temperature (52°C) (El Demerdash et al., 2003) (Table 1).

Thus, the development of these tools allows having today a wide range of expression vectors in *S. thermophilus*, including free or integrative vectors, selectable with an antibiotic resistance gene or a food-grade marker, and which can replicate, if necessary, in *E. coli* or other LAB.

2.2. Available promoters

As the control of the expression of a heterologous protein (expression level, induction time, and duration) is an important parameter to consider, the type of promoters used is therefore crucial. Promoters should have various strengths, or be inducible under *in vitro* or *in vivo* conditions. Some of them were developed to be active in both *S. thermophilus* and *E. coli*, such as the promoter ST_{P2201} (Solaiman and Somkuti, 1995) or the promoter P25 (Slos et al., 1991). Some promoters allow a strong and constitutive expression in *S. thermophilus*, such as the promoter of the *hblA* gene of *L. bulgaricus* ATCC 11842 (Chouayekh et al., 2009, Rhimi et al., 2011). Recently, the promoter of the *prtS* gene, encoding the cell-envelope protease of *S. thermophilus* has been used to heterologously express the cell-envelope proteinase PrtH of *L. helveticus*. As expected, the heterologous gene was transcribed at a level almost similar to that of the *prtS* gene in the wild-type strain (Lecomte et al., 2014).

Other promoters are inducible, for example by nisin as for *PnisA* which was used for the expression of the pediocin operon in LAB including *S. thermophilus* (Renye and Somkuti, 2010, Renye et al., 2011). Some strong promoters are induced under heat shock conditions (Gonzalez-Marquez et al., 1997; Petrova and Gouliamova, 2006). However, the use of such inducible promoters requires a good knowledge of the leakage issues. For example, Junjua et al. (2014) showed that the *lac* promoter, cloned upstream of the recombinase gene *cre*, induced its expression even in a lactose-free medium, albeit in smaller amounts than in a medium containing lactose. One approach to control the expression rate of the heterologous protein is to use a promoter of a gene whose expression is well known in *S. thermophilus* according to the growth phase and the environment. For example, ComRS-dependent regulation of competence is now well understood in *S. thermophilus* and genes containing a ComR-box in their promotive region can be induced up to 1000 times during the activation of competence by adding the competence-inducing pheromone ComS₁₇₋₂₄ (Fontaine et al., 2013).

Thus, various promoters can be used in *S. thermophilus*, rendering this species highly versatile for heterologous expression. Nevertheless, comparative studies on the strength of these promoters have to be performed if we want to better control the rate of synthesized protein, a crucial point to perform heterologous expression.

2.3. Available selection markers

The selection of clones having the expected construction constitutes another key step. Two types of selection markers are generally used, either an antibiotic resistance gene or other markers allowing an easy selection (Table 2). Four antibiotic resistance genes are functional in *S. thermophilus*: erythromycin (*erm*), chloramphenicol (*cat*), spectinomycin (*spc*) and kanamycin (*aphA3*) (Macrina et al., 1980; Solaiman and Somkuti, 1993; Bellanger et al., 2009; Gardan et al., 2009). Nevertheless, various non-antibiotic selection markers were analysed in the past few years to explore potential food-grade selection markers. Thus, it has been shown that the luciferase of *Photobacterium luminescens* (Fontaine et al., 2010a; Fontaine et al., 2013; Gardan et al., 2013) and the green fluorescent protein gene of the jellyfish *Aequorea victoria* (Solaiman and Somkuti, 1997a; Somkuti and Steinberg, 1999; Renye and Somkuti, 2009) were both functional in *S. thermophilus*. This is also the case for the *gusA* gene of *E. coli* which confers the β -glucuronidase activity (Mora et al., 2005; Blomqvist et al., 2006b; Liu et al., 2009; Chang and Yan, 2014) or the gene encoding the α -galactosidase of *Lc. raffinolactis* ATCC 43920, providing the ability to assimilate melibiose, up to 37°C (Labrie et al., 2005). Finally, a food-grade vector selectable through the resistance to heavy metals (cadmium resistance gene from *Lc. lactis* M71) has been successfully tested in *S. thermophilus* (Wong et al., 2003).

Table 2: Genes heterologously expressed in *S. thermophilus* and their main features

Heterologous genes	Original species	Utilization	References
<i>erm</i> , <i>aphA3</i> , <i>cat</i> , <i>spc</i>		Antibiotic resistance genes for selection	Macrina et al., 1980; Gardan et al., 2009; Solaiman and Somkuti, 1993; Bellanger et al., 2009
<i>luxAB</i> (luciferase)	<i>Photorabdus luminescens</i>	Food-grade marker	Fontaine et al., 2010a; Fontaine et al., 2013; Gardan et al., 2013
<i>gfp</i> (green fluorescent protein)	<i>Aequorea victoria</i>	Food-grade marker	Solaiman and Somkuti, 1997a; Somkuti and Steinberg, 1999; Renye et al., 2009
<i>gusA</i> (beta-glucuronidase)	<i>Escherichia coli</i>	Food-grade marker	Mora et al., 2005; Blomqvist et al., 2006b; Liu et al., 2009; Chang and Yan, 2014
<i>aga</i> (alpha-galactosidase)	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	Food-grade marker	Labrie et al., 2005
<i>cadA</i> and <i>cadC</i> (cadmium resistance)	<i>Lactococcus lactis</i>	Food-grade marker	Wong et al., 2003
<i>cho</i> (cholesterol oxidase)	<i>Streptomyces</i> sp.	Cholesterol reduction in dairy products	Somkuti et al., 1991
<i>mel</i> (tyrosinase)	<i>Streptomyces antibioticus</i>	Natural pigment production	Somkuti et al., 1993
<i>pepA-D</i> or <i>papA-D</i> (pediocin operon)	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Against <i>Listeria</i> in dairy food	Coderre and Somkuti, 1999; Renye and Somkuti, 2010
Bioactive peptides BL-11 and C-12	<i>Bos taurus</i>	Bioactive peptides from milk proteins	Renye and Somkuti, 2008
US100 L-AI (L-arabinose isomerase)	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Conversion of D-galactose in D-tagatose	Rhimi et al., 2011
<i>galK</i> (galactokinase) and <i>galM</i> (mutarotase)	<i>Streptococcus salivarius</i>	Galactose reduction in dairy products	Vaillancourt et al., 2004; Vaillancourt et al., 2008
<i>priH</i> (cell envelope proteinase)	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Secretion and anchoring	Lecomte et al., 2014
<i>sodA</i> (superoxide dismutase) and <i>mnkat</i> (catalase)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Antioxidant enzymes production to confer anti-inflammatory potential	Del Campo et al., 2014

List of abbreviations: erythromycin resistance gene (*erm*), kanamycin resistance gene (*aphA3*), chloramphenicol acetyl transferase gene (*cat*), and ampicillin resistance gene (*bla*).

2.4. Heterologous genes expressed in *S. thermophilus*

The development of plasmids, promoters, and selection markers, permitted in the last 20 years the introduction and expression of heterologous genes in *S. thermophilus* (Table 2). The first heterologous protein, the cholesterol oxidase from *Streptomyces* sp., was introduced in *S. thermophilus* ST128 by Somkuti et al. in 1991. The objective was to reduce the cholesterol level in dairy products. The gene encoding the tyrosinase of *Streptomyces antibioticus* was successfully expressed in *S. thermophilus* although no extracellular production of melanin-like pigment was observed (Somkuti et al., 1993). To functionalize food, the operon of pediocin of *P. acidilactici* was expressed in *S. thermophilus*. This allows a biopreservation of fermented dairy products preventing contaminations with undesirable microorganisms as *Listeria monocytogenes* (Coderre and Somkuti, 1999; Renye and Somkuti, 2010). Finally, once again to functionalize and increase the nutritional value of dairy products, two peptides derived from bovine milk proteins have been expressed in *S. thermophilus* (Renyé and Somkuti, 2008). More particularly, it was an antimicrobial peptide from lactoferrin, and a hypotensive peptide from α -s₁ casein. Other examples of heterologous expression with a view to functionalize food can be cited: Rhimi et al. (2011) introduced the gene encoding the L-arabinose isomerase of *B. stearothermophilus* in *S. thermophilus* and *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. This enzyme converts D-galactose into D-tagatose allowing reduction of caloric intake and sugar consumption, for example for diabetic patients (Rhimi et al., 2011). The *galK* gene of *S. salivarius* has also been introduced into *S. thermophilus* to promote galactose metabolism (Vaillancourt et al., 2004; Vaillancourt et al., 2008). This can be interesting for dairy industry as well as for human health. Indeed, it has been shown that accumulation of galactose in dairy products may lead to undesirable effects, as browning of Mozzarella, production of CO₂ by nonstarter bacteria and growth of undesirable microorganisms. Furthermore, excess of galactose in dairy products may affect human health, for example in people with galactosemia (Vaillancourt et al., 2004).

All of these genes were intracellularly expressed except pediocin operon which included two proteins enabling pediocin secretion. Recently, it has been shown that it was possible to use the secretion system of *S. thermophilus* to secrete high molecular weight heterologous proteins (Lecomte et al., 2014). The proof of concept was established using *L. helveticus* *prfH* gene encoding a cell envelope proteinase of more than 200 kDa. This heterologous protein was not only secreted but also anchored onto the cell-wall of *S. thermophilus* thanks to the presence of a LPXTG motif recognized by a sortase (Lecomte et al., 2014, Goh et al., 2011; Marraffini et al., 2006; Chang et al., 2012). This work showed that the Sec system of

S. thermophilus is able to secrete a heterologous protein of high molecular weight when an appropriate signal peptide is present. Recently, studies on signal peptide targeting were performed on other streptococci revealing two locations of protein secretion, one at the pole and one at the septum of the cell (Carlsson et al., 2006 and for review Schneewind and Missiakas, 2012). Canonical signal peptides seemed to address pre-proteins at the pole of cell whereas signal peptides displaying a YSIRK/GS sequence were targeted to the septum of the cell in *S. pyogenes* and *Staphylococcus aureus*. The YSIRK/GS sequence was also found in sequenced genomes of *S. thermophilus* like in the strain LMD-9 (Goh et al., 2011) indicating the possibility to target heterologous pre-proteins to a septum location at the cell-surface. Another secretion system, Tat, could be used to secrete folded proteins. This system seems to be conserved and specific signal peptides were identified in the genome of *S. thermophilus* strains (Hols et al., 2005 and Goh et al., 2011). The PrtH heterologous protease expressed by Lecomte et al. (2014) displays the signal sequence of PrtS of *S. thermophilus* LMD-9 which contains a YSIRK/GS sequence. Therefore, the heterologous protease PrtH might be secreted at the septum of *S. thermophilus* as it could be the case for the cell-envelope proteinase PrtS. Further, the use of the LPXTG motif allows covalently anchoring heterologous proteins of interest, for example antigens, to the cell-surface. This is all the more interesting as *S. thermophilus* has very few proteins present at the cell-surface, and only one housekeeping protease, HtrA, involved in the degradation of the misfolded exported proteins at the surface and whose gene can be deleted to avoid protein degradation. Thus it is possible to consider *S. thermophilus* as a vector of surface proteins or peptides.

3. Applications of *S. thermophilus* as a heterologous expression host and future trends

The possibility to employ *S. thermophilus* to express heterologous proteins offers numerous potential applications. Besides its wide use in numerous dairy products, *S. thermophilus* can resist harsh conditions prevailing in gastrointestinal track and remain metabolically active (Elli et al., 2006; Mater et al., 2005). Finally, it benefits from a positive health image, being one of the two bacteria used to manufacture yogurt, the only dairy food which obtained from EFSA a health claim relative to the improvement of lactose digestion in individuals suffering of lactose maldigestion (EFSA, 2010; Guarner et al., 2005). Hence, it can be used both to functionalize food and to deliver therapeutic molecules for the consumer.

3.1. Applications in food process

Rising health care costs and the consumer awareness that a strong link between diet and health exists has stimulated research for developing functional foods with specific health properties. Among them, fermented dairy products display a good health image, as underlined above with yogurt. Therefore, other examples of using a *S. thermophilus* strain expressing heterologous proteins or peptides in fermented milks will be cited below.

During dairy product fermentation, *S. thermophilus* is able to release bioactive peptides from bovine caseins, mainly due to the activity of its surface proteolytic system, especially the cell-envelope proteinase PrtS (Miclo et al., 2012). The number and nature of the peptides generated from milk caseins varies according to several parameters such as the nature of the strain used or the enzyme/substrate ratio. Indeed, under non-growth conditions, different digestion profiles of caseins were obtained with strains possessing the same allele of the *prtS* gene. Authors suggest that these differences could be due to a change in enzyme/substrate ratio consecutive to a change in expression of the proteinase (Miclo et al., 2012). The bioactive peptides generated by action of *S. thermophilus* are known to have antibacterial, antioxidant or immunomodulating activities or are angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors. It is now well established that other LAB are also able to release biofunctional peptides from caseins, such as for example *L. helveticus* (for review Sadat et al., 2011). This bacterium produces biofunctional peptides mainly derived from β -casein, such as ACE inhibitors, allowing reduction of hypertension. Among these peptides, we can cite IPP and VPP, that reach the small intestine since they are resistant to hydrolysis by gastrointestinal enzymes (Ohsawa et al., 2008). A part of biofunctional peptides produced by *L. helveticus* would be generated, as is the case for *S. thermophilus*, by the cell-envelope proteinases of the proteolytic system. In *L. helveticus*, four parietal proteases may be present at the cell surface and may have different activities and specificities towards caseins. Hence, the use in fermented milks of *S. thermophilus* strains expressing cell-envelope proteinases from other LAB instead of or in addition to PrtS could modify the bioactive peptide content of fermented milks and so constitutes a good approach to diversify the health properties. Indeed, the concomitant production of both LAB cell-envelope proteinases and PrtS could permit to exploit a synergy between the proteolytic action of these proteinases, resulting in the generation of other types of peptides with potential interesting biofunctional activities, some parts of milk proteins being inaccessible to a proteinase, but not to another one that will generate peptides that can then be hydrolysed by the first proteinase. However, this purpose requires that the heterologous proteinase is active.

It is also conceivable, for the development of functional foods, to construct recombinant strains of *S. thermophilus* that express bioactive peptides or other beneficial molecules in dairy products. Very few works have been done on the expression of bioactive peptides in LAB. ACE inhibitors peptides from β -casein were expressed in *Bifidobacterium pseudocatenulatum* (Losurdo et al., 2013) and two peptides, one with antimicrobial activity and derived from lactoferrin and the second with hypotensive activity and derived from α_{s1} -casein were expressed in *S. thermophilus*. It is therefore possible to consider achieving genetically engineering of *S. thermophilus* cloning sequence of bioactive peptides, in order to increase their availability, and thus potentially enhance the functionality and nutritional value of fermented dairy and other food products. However, genes encoding these peptides should be placed downstream a strong promoter to be massively expressed, and the synthesized peptides should contain a signal sequence to be exported.

Some studies have focused on the construction of *S. thermophilus* recombinant strains to improve healthy and techno-functional characteristics of fermented milks, for example increasing production of capsular polysaccharides (CPS) or exopolysaccharides (EPS), which not only influence techno-functional properties but also exert a probiotic effect (Kanmani et al., 2013). Thus, EPS are involved in the texture of fermented dairy products, allowing syneresis reduction, firmness enhancement and mouthfeel improvement of yogurt (Robitaille et al., 2007). In order to increase EPS production *in situ*, particularly in low-fat and free-fat yogurts where EPS can be used as biothickeners, a recombinant galactose-positive EPS⁺ strain was generated from a galactose-negative EPS⁺ parental strain introducing the *galK* gene of *S. salivarius* (Robitaille et al., 2007; Robitaille et al., 2009). The galactokinase encoded by *galK* is a key enzyme of the Leloir pathway and it has been shown that strains producing enzymes of the Leloir pathway at high levels can synthesize more EPS than the parental strain (Levander et al., 2002; Svensson et al., 2005). Concerning human health, it has been shown that the EPS1190 naturally produced by *S. thermophilus* CRL1190 plays a role in protecting the gastrointestinal system by stimulating epithelial cells regeneration and immunological defence mechanisms (Marcial et al., 2013). Thus, construction of *S. thermophilus* strains producing various types of EPS could be used in novel functional foods, for example as an alternative natural therapy for chronic gastritis induced by acetyl-salicylic acid (Rodriguez et al., 2010).

Another application of recombinant strains of *S. thermophilus* could be to produce bacteriocins in food. The presence of bacteriocins in food allows to protect it from spoilage and/or pathogenic flora, and therefore to limit the use of intensive physical treatments and/or

chemical preservatives. *S. thermophilus* is able to produce bacteriocins, but it has been shown that inhibition of other starter bacteria was more common than inhibition of unwanted microorganisms (Rossi et al., 2013). Nevertheless, inhibition of *Staphylococcus aureus* and some enterococci involved in the production of biogenic amines in cheeses has been highlighted. It could be judicious to express in *S. thermophilus* a heterologous bacteriocin directed against unwanted microorganisms and which affects neither *S. thermophilus* nor LAB of interest, to enhance safety of dairy products. It would add an upper level of defence already done by milk acidification.

Thus, although the potential uses of a *S. thermophilus* bacterium expressing heterologous proteins in food are very wide and promising, the use of genetically modified bacteria (GMO) is still hampered by legal issues and a rather negative general public opinion. However, in the pharmaceutical industry, the application of GMO seems much more acceptable, if specific containment strategies are implemented to prevent the release of GMO into the environment and ensure the use of food-grade markers (Foligné et al., 2013).

3.2. Applications in gastrointestinal tract

The production of beneficial molecules directly into the gastrointestinal tract (GIT) allows eliminating some of the problems that might be encountered in functional food such as instability of bioactive peptides or bioavailability in human organism. Indeed, even if *S. thermophilus* is able to release bioactive peptides from milk caseins during the manufacturing process of dairy products, these peptides can be degraded by the numerous proteolytic enzymes such as peptidases already present or progressively released in the dairy products during aging. In addition, the opportunity to express bioactive peptides at the right time and place in the GIT would prevent their further hydrolysis by digestive enzymes and intestinal peptidases and therefore enables these peptides to reach their target. For example, it has been shown that to exert their antihypertensive effects, peptides should reach the bloodstream in sufficient concentration. It is for this reason that many bioactive peptides from milk proteins showed a biofunctional activity *in vitro* but little or none *in vivo* (for review Moller et al., 2008; Haque et al., 2009).

It is now well established that *S. thermophilus* is able to survive the intestinal passage and is metabolically active. Indeed, its recovery in faeces of human volunteers consuming yogurt proved that this bacterium remains alive during its transit through the digestive tract

(Elli et al., 2006; Mater et al., 2005). Metagenomic sequencing from faecal samples of European individuals reveals an abundant presence of genes corresponding to *S. thermophilus* LMD-9 strain (Qin et al., 2010). Furthermore, the production of active β -galactosidase in the second half of the small intestine by the strain FB13 further suggests that *S. thermophilus* remains metabolically active during its digestive transit which could explain the improvement of lactose digestion observed in intolerant patients after yogurt consumption (Mater et al., 2005; Guarner et al., 2005). This allows considering *S. thermophilus* as a tool to deliver beneficial molecules specifically in the small intestine, i.e. where absorption is possible. The use of *S. thermophilus* to produce beneficial molecules in the GIT at a specific location is even more conceivable since recently recombinase-based *in vivo* expression technology, which allows identifying promoters specifically activated in particular complex environments such as GIT, was successfully developed in *S. thermophilus* (Junjua et al., 2014). It will be therefore possible to imagine to clone downstream of promoters induced at certain part of the GIT, sequences encoding bioactive peptides or biofunctional molecules which will therefore be expressed and exported through a signal sequence at this specific location of GIT.

In lactococci and lactobacilli, recombinant strains were constructed to delivery directly *in vivo* molecules of interest. These strains expressing therapeutic proteins such as cytokines, antigens or enzymes were constructed in order to develop novel oral vectors for delivering therapeutic proteins and DNA vaccines (Bermúdez-Humarán et al., 2011). The prophylactic and therapeutic effects in different animal models have been proved. It has also been shown in *L. casei* and *Lc. lactis* that it is possible to prevent or treat cows' milk-related allergies using strains expressing the bovine β -lactoglobulin (Hazebrouck et al., 2007; Cortes-Perez et al., 2009). Such molecules could be produced by a *S. thermophilus* strain which additionally can be resistant to technological stress and be used to manufacture dairy products. Finally, recent work on *S. thermophilus* CRL807 recombinants that heterologously produce superoxide dismutase and/or catalase demonstrated their anti-inflammatory potentials *in vivo*. These recombinants decreased the severity of the inflammation in mice, with less body weight loss, lower macroscopic and histological damage scores in the large intestine, and a decrease of bacterial translocation to liver, compared to the inflammation control (Del Carmen et al., 2014).

4. Conclusion

Various efficient genetic tools including plasmids, promoters, and markers of selection are now available to achieve heterologous expression in *S. thermophilus*. Of course, further improvements are needed such as the use of promoters allowing the expression of heterologous proteins in different environments including intestinal environment without transcriptional leakage, or the efficient secretion and anchoring of mature and active proteins. Indeed, producing PrtH from *L. helveticus* on the *S. thermophilus* cell-wall was unfortunately not succeeded by a proteolytic activity of the proteinase, suggesting at least a problem in the maturation process (Lecomte et al., 2014). Another parameter to consider for a successful expression of a heterologous protein is the codon usage and genomic GC content, by exchanging the unfavourable or rare codons with more abundant ones and keeping the same final amino acid sequence. For example, Sastalla et al. (2009) have synthesized a codon-optimized *gfp* gene to improve expression of this marker in bacteria with a low genomic GC content.

Besides tools for the production of heterologous proteins which have been mentioned above, the discovery of natural competence in *S. thermophilus* strongly enhances its attractiveness as new host for heterologous protein production. Indeed, it offers the possibility to use either plasmids or linear DNA fragments to genetically engineer this bacterium, compared to other LAB which are also food-grade bacteria but do not exhibit this competence, such as *Lc. lactis*. Finally, Fontaine et al. (2010a and 2010b) showed that natural transformation can be used as a tool to obtain marker-free strains. Moreover, the transformation rate is so high for some strains of *S. thermophilus* (close to 1%) (Fontaine et al., 2010b) that it is now imaginable to insert any DNA construction in a specific locus of *S. thermophilus* chromosome or to introduce a plasmid with appropriate construction without any selection gene (Blomqvist et al., 2006a), and to find the appropriate recombinant clone through PCR screening.

Thanks to its GRAS status and several established positive roles on human health, *S. thermophilus* benefits from a positive image and is massively consumed every day around the world. This makes it an ideal tool for supplying consumers with beneficial molecules either through their production directly in the food, or through their expression in the GIT. Indeed, the delivery of therapeutic proteins or DNA by LAB offers exciting opportunities, for the purpose of vaccination or for the treatment of various diseases. For example, delivering anti-inflammatory cytokines or downregulating proinflammatory cytokines is important in case of inflammatory bowel diseases. Finally delivery of allergens for the modulation of

allergic disorders represents the second most popular application of therapeutic proteins (Berlec et al., 2012).

Acknowledgements

Xavier LECOMTE is the recipient of a Ph.D. fellowship from the “Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche”. This work follows a conference given during the “19^{ème} colloque du Club des Bactéries Lactiques in October 2013.

References

- Bellanger, X., Roberts, A.P., Morel, C., Choulet, F., Pavlovic, G., Mullany, P., Decaris, B., Guédon, G., 2009. Conjugative Transfer of the Integrative Conjugative Elements ICES_{St1} and ICES_{St3} from *Streptococcus thermophilus*. J. Bacteriol. 191, 2764–2775.
- Berlec, A., Ravnikar, M., Strukelj, B., 2012. Lactic acid bacteria as oral delivery systems for biomolecules. Pharmazie 67, 891-898.
- Bermúdez-Humarán, L.G., Kharrat, P., Chatel, J.M., Langella, P. 2011. Lactococci and lactobacilli as mucosal delivery vectors for therapeutic proteins and DNA vaccines. Microbial. Cell Fact. 10(Suppl 1), S4.
- Bermúdez-Humarán, L.G., Aubry, C., Motta, J.P., Deraison, C., Steidler, L., Vergnolle, N., Chatel, J.M., Langella, P., 2013. Engineering lactococci and lactobacilli for human health. Curr. Opin. Microbiol. 16, 278–283.
- Blomqvist, T., Steinmoen, H., Havarstein, L.S., 2006a. Natural genetic transformation: a novel tool for efficient genetic engineering of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 72, 6751-6756.
- Blomqvist, T., Steinmoen, H., Havarstein, L.S., 2006b. Pheromone-induced expression of recombinant proteins in *Streptococcus thermophilus*. Arch. Microbio. 186, 465-473.
- Carlsson, F., Stalhammar-Carlemalm, M., Flardh, K., Sandin, C., Carlemalm, E., Lindahl, G. 2006. Signal sequence directs localized secretion of bacterial surface proteins. Nature 442, 943-946.

- Chang, O.K., Perrin, C., Galia, W., Saulnier, F., Miclo, L., Roux, E., Driou, A., Humbert, G., Dary, A., 2012. Release of the cell-envelope protease PrtS in the growth medium of *Streptococcus thermophilus* 4F44. *Int. Dairy J.* 23, 91-98.
- Chang, S.-M., Yan, T.-R., 2014. Genetic engineering techniques for lactic acid bacteria. Construction of a stable shuttle vector and expression vector for β -glucuronidase. *Biotechnol. Lett.* 36, 327–335.
- Chouayekh, H., Serror, P., Boudebouze, S., Maguin, E., 2009. Highly efficient production of the staphylococcal nuclease reporter in *Lactobacillus bulgaricus* governed by the promoter of the *hlyA* gene. *FEMS Microbiol. Lett.* 293, 232–239.
- Coderre, P.E., Somkuti, G.A., 1999. Cloning and expression of the pediocin operon in *Streptococcus thermophilus* and other lactic fermentation bacteria. *Curr. Microbiol.* 39, 295-301.
- Cortes-Perez, N.G., Ah-Leung, S., Bermúdez-Humarán, L.G., Corthier, G., Langella, P., Wal, J.M., Adel-Patient, K., 2009. Allergy therapy by intranasal administration with recombinant *Lactococcus lactis* producing bovine beta-lactoglobulin. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 150, 25-31.
- Del Carmen, S., De Moreno de LeBlanc, A., Martin, R., Chain, F., Langella, P., Bermúdez-Humarán, L.G., LeBlanc, J.G., 2014. Genetically engineered immunomodulatory *Streptococcus thermophilus* strains producing antioxidant enzymes exhibit enhanced anti-inflammatory activities. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 869-877.
- Dandoy, D., Fremaux, C., De Frahan, M.H., Horvath, P., Boyaval, P., Hols, P., Fontaine, L., 2011. The fast milk acidifying phenotype of *Streptococcus thermophilus* can be acquired by natural transformation of the genomic island encoding the cell-envelope proteinase PrtS. *Microb. Cell Fact.* 10, S21.
- EFSA Journal, 2010. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to live yoghurt cultures and improved lactose digestion (ID 1143, 2976) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006, 8:1763.

- El Demerdash, H.A.M., Heller, K.J., Geis, A., 2003. Application of the *shsp* gene, encoding a small heat shock protein, as a food-grade selection marker for lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4408–4412.
- Elli, M., Callegari, M.L., Ferrari, S., Bessi, E., Cattivelli, D., Soldi, S., Morelli, L., Feuillerat, N.G., Antoine, J.M., 2006. Survival of yogurt bacteria in the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5113–5117.
- Foligné, B., Daniek, C., Pot, B., 2013. Probiotics from research to market: the possibilities, risks and challenges. *Curr. Opin. Microbiol.* 16, 284–292.
- Fontaine, L., Boutry, C., De Frahan, M.H., Delplace, B., Fremaux, C., Horvath, P., Boyaval, P., Hols, P., 2010a. A novel pheromone quorum-sensing system controls the development of natural competence in *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*. *J. Bacteriol.* 192, 1444–1454.
- Fontaine, L., Dandoy, D., Boutry, C., Delplace, B., de Frahan, M.H., Fremaux, C., Horvath, P., Boyaval, P., Hols, P., 2010b. Development of a versatile procedure based on natural transformation for marker-free targeted genetic modification in *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7870–7877.
- Fontaine, L., Goffin, P., Dubout, H., Delplace, B., Baulard, A., Lecat-Guillet, N., Chambellon, E., Gardan, R., Hols, P., 2013. Mechanism of competence activation by the ComRS signalling system in streptococci. *Mol. Microbiol.* 87, 1113–1132.
- 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, 4647–4655.
- Gardan, R., Besset, C., Gitton, C., Guillot, A., Fontaine, L., Hols, P., Monnet, V., 2013. Extracellular life cycle of ComS, the competence-stimulating peptide of *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.* 195, 1845–1855.
- Geis, A., El Demerdash, H.A.M., Heller, K.J., 2003. Sequence analysis and characterization of plasmids from *Streptococcus thermophilus*. *Plasmid* 50, 53–69.
- Goh, Y.J., Goin, C., O'Flaherty, S., Altermann, E., Hutkins, R., 2011. Specialized adaptation of a lactic acid bacterium to the milk environment: the comparative genomics of *Streptococcus thermophilus* LMD-9. *Microb. Cell Fact.* 10, S22.

- Gonzalez-Marquez, 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.
- Green, M.R., Sambrook, J., 2012. *Molecular cloning: a laboratory manual*. N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Guarner, F., Perdigon, G., Corthier, G., Salminen, S., Koletzko, B., Morelli, L., 2005. Should yoghurt cultures be considered probiotic. *Br. J. Nutr.* 93, 783-786.
- Haque, E., Chand, R., Kapila, S., 2009. Biofunctional properties of bioactive peptides of milk origin. *Food Rev. Int.* 25, 28-43.
- Hazebrouck, S., Pothelune, L., Azevedo, V., Corthier, G. Wal, J.M., Langella, P., 2007. Efficient production and secretion of bovine beta-lactoglobulin by *Lactobacillus casei*. *Microb. Cell Fact.* 6, 6-12.
- 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 Microbial. Rev.* 29, 435-463.
- Junjua, M., Galia, W., Gaci, N., Uriot, O., Genay, M., Bachmann, H., Kleerebezem, M., Dary, A., Roussel, Y., 2014. Development of the recombinase-based in vivo expression technology in *Streptococcus thermophilus* and validation using the lactose operon promoter. *J. Appl. Microbiol.* 116, 620-631.
- Kanmani, P., Kumar, R.S., Yuvaraj, N., Paari, K.A., Pattukumar, V., Arul, V., 2013. Probiotics and its functionally valuable products-A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 53, 641-658.
- Kondo, J. K., McKay, L. L., 1984. Plasmid transformation of *Streptococcus lactis* protoplasts: optimization and use in molecular cloning. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 252-259.
- Labrie, S., Bart, C., Vadeboncoeur, C., Moineau, S., 2005. Use of an α -galactosidase gene as a food-grade selection marker for *Streptococcus thermophilus*. *J. Dairy Sci.* 88, 2341–2347.

- Lecomte, X., Gagnaire, V., Briard-Brion, V., Jardin, J., Lortal, S., Dary, A., Genay, M., 2014. The naturally competent strain *Streptococcus thermophilus* LMD-9 as a new tool to anchor heterologous proteins on the cell surface. *Microb. Cell Fact.* 13, 82.
- Levander, F., Svensson, M., Rådström, P., 2002. Enhanced exopolysaccharide production by metabolic engineering of *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 784-790.
- 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 Microbiol. Lett.* 297, 164-172.
- Losurdo, L., Quintieri, L., Caputo, L., Gallerani, R., Mayo, B., De Leo, F., 2013. Cloning and expression of synthetic genes encoding angiotensin-I converting enzyme (ACE)-inhibitory bioactive peptides in *Bifidobacterium pseudocatenulatum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 340, 24-32.
- Macrina, F.L., Jones, K.R., Wood, P.H., 1980. Chimeric streptococcal plasmids and their use as molecular cloning vehicles in *Streptococcus sanguis* (Challis). *J. Bacteriol.* 143, 1425-1435.
- Maguin, E., Duwat, P., Hege, T., Ehrlich, S.D., Gruss, A., 1992. New thermosensitive plasmid for gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 174, 5633–5638.
- Maguin, E., Prevost, H., Ehrlich, S.D., Gruss, A., 1996. Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 178, 931-935.
- Marcial, G., Messing, J., Menchicchi, B., Goycoolea, F.M., Faller, G., Font de Valdez, G., Hensel, A., 2013. Effects of polysaccharide isolated from *Streptococcus thermophilus* CRL1190 on human gastric epithelial cells. *Int. J. Biol. Macromol.* 62, 217-224.
- Marraffini, L.A., Dedent, A.C., Schneewind, O., 2006. Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 192-221.
- Mater, D.D.G., Bretigny, L., Firmesse, O., Flores, M.J., Mogenet, A., Bresson, J.L., Corthier, G., 2005. *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* survive gastrointestinal transit of healthy volunteers consuming yogurt. *FEMS Microbiol. Lett.* 250, 185-187.

- Miclo, L., Roux, E., Genay, M., Brusseaux, E., Poirson, C., Jameh, N., Perrin, C., Dary, A., 2012. Variability of hydrolysis of β -, α s1-, and α s2-caseins by 10 strains of *Streptococcus thermophilus* and resulting bioactive peptides. J. Agric. Food Chem. 60, 554-565.
- Moller, N.P., Scholz-Ahrens, K.E., Roos, N., Schrezenmeir, J., 2008. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. Eur. J. Nutr. 47, 171-182.
- 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*. Res. Microbiol. 156, 897-903.
- Ohsawa, K., Satsu, H., Ohki, K., Enjoh, M., Takano, T., Shimizu, M., 2008. Producibility and digestibility of antihypertensive β -casein tripeptides, Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro, in the gastrointestinal tract: analyses using an *in vitro* model of mammalian gastrointestinal digestion. J. Agric. Food Chem. 56, 854–858.
- O’Sullivan, T.F., Fitzgerald, G.F., 1999. Electrotransformation of industrial strains of *Streptococcus thermophilus*. J. Appl. Microbiol. 86, 275-283.
- Petrova, P.M., Gouliamova, D.E., 2006. Rapid screening of plasmid-encoded small hsp-genes in *Streptococcus thermophilus*. Curr. Microbiol. 53, 422–427.
- Qin, J.J., Li, R.Q., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature 464, 59-U70.
- Renye, J.A., Somkuti, G.A., 2008. Cloning of milk-derived bioactive peptides in *Streptococcus thermophilus*. Biotechnol. Lett. 30, 723-730.
- Renye, J.A., Somkuti, G.A., 2009. Insertion of a heterologous gene construct into a non-functional ORF of the *Streptococcus thermophilus* chromosome. Biotechnol. Lett. 31, 759-764.
- Renye, J.A., Somkuti, G.A., 2010. Nisin-induced expression of pediocin in dairy lactic acid bacteria. J. Appl. Microbiol. 108, 2142–2151.

- Renye, J.A., Somkuti, G.A., Garabal, J.I., Du, L., 2011. Heterologous production of pediocin for the control of *Listeria monocytogenes* in dairy foods. *Food Control* 22, 1887-1892.
- Rhimi, M., Chouayekh, H., Gouillouard, I., Maguin, E., Bejar, S., 2011. Production of D-tagatose, a low caloric sweetener during milk fermentation using L-arabinose isomerase. *Bioresour. Technol.* 102, 3309-3315.
- Robitaille, G., Moineau, S., St-Gelais, D., Vadeboncoeur, C., Britten, M., 2007. Galactose metabolism and capsule formation in a recombinant strain of *Streptococcus thermophilus* with a galactose-fermenting phenotype. *J. Dairy Sci.* 90, 4051-4057.
- Robitaille, G., Tremblay, A., Moineau, S., St-Gelais, D., Vadeboncoeur, C., Britten, M., 2009. Fat-free yogurt made using a galactose-positive exopolysaccharide producing recombinant strain of *Streptococcus thermophilus*. *J. Dairy Sci.* 92, 477-482.
- Rodriguez, N., Salgado, J.M., Cortes, S., Dominguez, J.M., 2010. Alternatives for biosurfactants and bacteriocins extraction from *Lactococcus lactis* cultures produced under different pH conditions. *Lett. Appl. Microbiol.* 51, 226-233.
- Rossi, F., Marzotto, M., Cremonese, S., Rizzotti, M., Torriani, S., 2013. Diversity of *Streptococcus thermophilus* in bacteriocin production: inhibitory spectrum and occurrence of thermophilin genes. *Food Microbiol.* 35, 27-33.
- Sadat-Mekmene, L., Genay, M., Atlan, D., Lortal, S., Gagnaire, S., 2011. Original features of cell-envelope proteinases of *Lactobacillus helveticus*. *Int. J. Food Microbiol.* 146, 1-13.
- Sastalla, I., Chim, K., Cheung, Y.C., Pomerantsev, A.P., Leppla, S.H., 2009. Codon-optimized fluorescent proteins designed for expression in low-GC Gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 2099-2110.
- Shareck, J., Choi, Y., Lee, B., Miguez, C.B., 2004. Cloning vectors based on cryptic plasmids isolated from lactic acid bacteria: their characteristics and potential applications in biotechnology. *Crit. Rev. Biotechnol.* 24, 155-208.
- Schneewind, O., Missiakas, D.M., 2012. Protein secretion and surface display in Gram-positive bacteria. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 367, 1123-1139.

- Slos, P., Bourquin, J.C., Lemoine, Y., Mercenier, A., 1991. Isolation and characterization of chromosomal promoters of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 57, 1333-1339.
- Solaiman, D.K.Y., Somkuti, G.A., 1993. Shuttle vectors developed from *Streptococcus thermophilus* native plasmid. Plasmid 30, 67-78.
- Solaiman, D.K.Y., Somkuti, G.A., 1995. Expression of *Streptomyces melC* and *choA* genes by a cloned *Streptococcus thermophilus* promoter STp2201. J. Ind. Microbiol. 15, 39-44.
- Solaiman, D.K.Y., Somkuti, G.A., 1997a. Construction of a green-fluorescent protein-based, insertion-inactivation shuttle vector for lactic acid bacteria and *Escherichia coli*. Biotechnol. Lett. 19, 1175-1179.
- Solaiman, D.K.Y., Somkuti, G.A., 1997b. Characterization of pER371-based *Streptococcus thermophilus*-*Escherichia coli* shuttle vectors. Biotechnol. Lett. 19, 595-598.
- Somkuti, G.A. Steinberg, D.H., 1986. Distribution and analysis of plasmids in *Streptococcus thermophilus*. J Ind Microbiol. 1, 157-163.
- Somkuti, G.A. Steinberg, D.H., 1988. Genetic transformation of *Streptococcus thermophilus* by electroporation. Biochimie 70, 579-585.
- Somkuti, G.A., Solaiman, D.K.Y., Johnson, T.L., Steinberg, D.H., 1991. Transfer and expression of a *Streptomyces* cholesterol oxidase gene in *Streptococcus thermophilus*. Biotechnol. Appl. Biochem. 13, 238-245.
- Somkuti, G.A., Solaiman, D.K.Y., Steinberg, D.H., 1993. Cloning of a tyrosinase gene in *Streptococcus thermophilus*. Biotechnol. Lett. 15, 773-778.
- Somkuti, G.A., Steinberg, D.H., 1999. Promoter activity of the pER341-borne ST(Phsp) in heterologous gene expression in *Escherichia coli* and *Streptococcus thermophilus*. FEMS Microbiol Lett 179, 431-436.
- Somkuti, G.A., Steinberg, D.H., 2003. Pediocin production by recombinant lactic acid bacteria. Biotechnol. Lett. 25, 473-477.
- Svensson, M., Waak, E., Svensson, U., Rådström, P., 2005. Metabolically improved exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* and its influence on the rheological properties of fermented milk. Appl. Environ. Microbiol. 71, 6398-6400.

- Turgeon, N., Moineau, S., 2001. Isolation and characterization of a *Streptococcus thermophilus* plasmid closely related to the pMV158 family. *Plasmid* 45, 171-183.
- 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, 4596-4603.
- Vaillancourt, K., Bedard, N., Bart, C., Tessier, M., Robitaille, G., Turgeon, N., Frenette, M., Moineau, S., Vadeboncoeur, C., 2008. Role of *galK* and *galM* in galactose metabolism by *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1264-1267.
- Wong, W.Y., Su, P., Allison, G.E., Liu, C.-Q., Dunn, N.W., 2003. A potential food-grade cloning vector for *Streptococcus thermophilus* that uses cadmium resistance as the selectable marker. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5767-5771.

Valorisation des résultats & Formations

Valorisation des résultats

Publications

Xavier Lecomte, Valérie Gagnaire, Valérie Briard-Bion, Julien Jardin, Sylvie Lortal, Annie Dary et Magali Genay. 2014. The naturally competent strain *Streptococcus thermophilus* LMD-9 as a new tool to anchor heterologous proteins on the cell surface *Microbial Cell Factories* , volume 13 pages 1 à 14, <http://www.microbialcellfactories.com/content/13/1/82> - état : paru.

Xavier LECOMTE, Valérie GAGNAIRE, Sylvie LORTAL, Annie DARY et Magali GENAY. 2014. *Streptococcus thermophilus*, an emerging and promising tool for heterologous expression: advantages and future trends *Food Microbiology* , 34 pages - état : proposé.

Communications Orales

Magali GENAY, Xavier LECOMTE, Valérie BRIARD-BION, Julien JARDIN, Sylvie LORTAL, Valérie GAGNAIRE, Annie DARY. 2013. Expression hétérologue de la protéase de paroi PrtH de *Lactobacillus helveticus* chez *Streptococcus thermophilus* LMD-9 *CBL - Club des Bactéries Lactiques*.

Valérie GAGNAIRE, Xavier LECOMTE, Romain RICHOUX, Jean-René KERJEAN, Anne THIERRY. 2014. Proteinases of *Lactobacillus helveticus* and their distinct capability to hydrolyze α s1 and β -caseins at different NaCl concentrations 1st International PLEASURE conference.

Valérie GAGNAIRE, Xavier LECOMTE, Nicolas PINON, Romain RICHOUX, Lydie AUBERT, Marine NURDIN, Jessica WARLOUZEL, Jean-René KERJEAN, Anne THIERRY. 2014. Proteinases of *Lactobacillus helveticus* and their distinct capability to hydrolyze α s1 and β -caseins at different NaCl concentrations: from in vitro experiments to Swiss-type cheeses. 17 Word Congress of Food Science & Technology (IUFoST)

Posters

Xavier LECOMTE, Magali GENAY, Valérie GAGNAIRE, Sylvie LORTAL et Annie DARY 2012. Expression des protéases de *Lactobacillus helveticus* clonées chez *Streptococcus thermophilus* en matrices laitières *Séminaire RP2E*.

Xavier LECOMTE, Magali GENAY, Valérie GAGNAIRE, Sylvie LORTAL, Annie DARY 2012. Expression hétérologue de protéases pariétales de *Lactobacillus helveticus* chez *Streptococcus thermophilus*. *CBL - Club des Bactéries Lactiques*.

Xavier LECOMTE, Magali GENAY, Valérie BRIARD-BION, Julien JARDIN, Sylvie LORTAL, Valérie GAGNAIRE, Annie DARY. 2013. Heterologous Expression of PrtH a Cell Envelope Proteinase of *Lactobacillus helveticus* in *Streptococcus thermophilus* LMD-9 *NIZO conference*.

Formations

Projet professionnel

- Entreprendre une voie de professionnalisation du doctorat (12 heures)
- Formation « Intelligence collective » : (8 heures)

Séminaires internes ED

- Expression hétérologue de protéases pariétales de *Lactobacillus helveticus* chez *Streptococcus thermophilus* (6 heures)

Formations transversales

- MST 06 – Analyse de données (20 heures)
- MST 08 - Filières agroalimentaires: de la ressource à l'aliment (12 heures)

Doctoriales

- Doctoriales de Lorraines 2011 (35 heures)

Résumé : Les produits laitiers fermentés sont régulièrement consommés et appréciés en Europe et dans les pays développés. L'hydrolyse des protéines du lait, telles les caséines, lors de la fermentation par les bactéries lactiques, contribue aux propriétés de ces produits fermentés. En effet, cette protéolyse peut aboutir à la génération de peptides technofonctionnels, agissant sur les qualités organoleptiques du produit, et/ou des peptides bioactifs qui ont un effet positif sur notre organisme. La protéolyse est réalisée par le système protéolytique des bactéries lactiques, composé de trois types d'acteurs : les protéases de paroi, les transporteurs de peptides et les peptidases. Les premiers acteurs de la protéolyse sont les protéases de paroi qui, en raison du contact direct avec le substrat lait/matrice laitière, orientent la protéolyse en initiant l'hydrolyse des protéines et des gros peptides.

Parmi les bactéries lactiques, deux espèces sont utilisées comme co-levains dans la fabrication de fromages à pâte pressée cuite tel que le Comté ou l'Emmental : *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus helveticus*. *S. thermophilus*, comme la majorité des espèces des bactéries lactiques, peut produire une protéase de paroi, PrtS. *L. helveticus* présente, quant à elle, une situation originale car elle peut posséder jusqu'à 4 protéases de paroi, PrtH, PrtH2, PrtH3 et PrtH4 comme c'est le cas de la souche CNRZ32.

L'objectif de ce travail de thèse est de mieux comprendre les propriétés protéolytiques de *L. helveticus* et *S. thermophilus* en déterminant comment leur système protéolytique module le profil d'hydrolyse des caséines en matrice laitière. Face aux difficultés rencontrées dans la purification de chacune de ces protéases et le manque d'outils génétiques chez *L. helveticus* pour déléter les gènes de ces dernières, une stratégie basée sur l'expression hétérologue de ces protéases chez *S. thermophilus* a été choisie. Ainsi, la protéase PrtH de *L. helveticus* CNRZ32 a été produite de façon hétérologue chez *S. thermophilus* LMD-9. Cette sécrétion hétérologue a permis d'une part de montrer la faisabilité de la sécrétion puis de l'ancrage d'une protéine hétérologue à la surface de *S. thermophilus* et d'autre part de soulever des questions quant à l'activité de chacune des protéases de paroi de *L. helveticus*. Afin d'y répondre, des souches de *L. helveticus* ne produisant qu'une seule protéase de paroi ainsi que la souche modèle *L. helveticus* CNRZ32 produisant les quatre protéases à sa surface ont été sélectionnées. Les activités des systèmes protéolytiques de surface de ces souches ainsi que celles de souches de *S. thermophilus* ont été testées par hydrolyse des caséines α_{s1} et β dans des conditions *in vitro* mimant les conditions du fromage, en faisant varier les paramètres de pH et de sel. Par la suite, des mini fromages de type Emmental ont été produits avec les souches les plus protéolytiques.

Nos résultats tendent à montrer que *L. helveticus* ne présenterait finalement que peu de différences avec les autres bactéries lactiques. En effet, même si certaines souches de *L. helveticus* peuvent posséder jusqu'à quatre protéases de paroi, seule PrtH3 semble fortement active sur les caséines bovines. *In vitro*, les souches les plus protéolytiques dégradaient préférentiellement la caséine β et le taux de dégradation des caséines α_{s1} et β était augmenté à pH 5.2, pH de l'Emmental, comparativement à pH 7.5. Concernant l'effet de la teneur en sel sur l'activité protéolytique des souches de *L. helveticus* et *S. thermophilus* *in vitro* et *in situ*, les variations observées étaient surtout remarquables pour des concentrations supérieures à celles retrouvées en Emmental (1,5% NaCl m/v). Ainsi, *in vitro*, une augmentation du taux de sel multiplié par 2 ou 3 semblait diminuer jusqu'à deux fois l'activité protéolytique selon la souche et, en fromage, une augmentation par deux de la teneur en sel conduisait à une baisse de 16% de petits peptides générés.

Mots clés : Protéase de paroi, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus*, Protéolyse, Expression Hétérologue, PrtH

Abstract : Fermented dairy products are commonly consumed and much appreciated in Europe and in developed countries. The hydrolysis of milk proteases, such as caseins, is a process which is carried out by lactic acid bacteria (LAB) during fermentation and contributes to the properties of fermented products. Indeed, proteolysis can lead to the formation of techno-functional peptides which have an impact on the organoleptic qualities of products; it can also lead to the formation of bioactive peptides which have a beneficial effect on our body. Proteolysis is achieved by the proteolytic system in LAB which comprises three elements: cell-envelope proteinases (CEPs), peptide transporters and peptidases. Most involved in proteolysis, CEPs are in direct contact with the milk substrate/dairy matrix; they therefore direct proteolysis and initiate the hydrolysis of proteins and large peptides.

Among the many LAB available, two are used as starter cultures in the production of hard-cooked cheese like Comté or Emmental, i.e.: *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus helveticus*. As most LAB, *S. thermophilus* can produce a cell-envelope proteinase (CEP), PrtS. The situation is slightly different with *L. helveticus*, as it can produce up to four CEPs: PrtH, PrtH2, PrtH3 and PrtH4. This is the case with the CNRZ32 strain for example.

The aim of this research is to better understand the proteolytic properties of *L. helveticus* and *S. thermophilus* and identify how their proteolytic systems adjust the hydrolysis profile of caseins in a dairy matrix. Due to difficulties encountered in the purification step for each of these proteinases, and due to the lack of genetic tools which would have allowed gene deletion in *L. helveticus*, the selected strategy involves the heterologous expression of these proteinases in *S. thermophilus*. Therefore, *L. helveticus* CNRZ32 proteinase PrtH was heterologously produced in *S. thermophilus* LMD-9. Such heterologous secretion allowed evidencing the fact that secretion, followed by the anchoring of a heterologous protein to the surface of *S. thermophilus*, was feasible. This research also emerged questions with regards to the activity of each individual *L. helveticus* CEPs. In order to answer these questions, *L. helveticus* strains which only produce one CEP were selected, along with the control strain, *L. helveticus* CNRZ32 which produces 4 CEPs. The activity of these proteolytic systems on the surface of these strains was tested, as well as with the activity of the *S. thermophilus* strains. Tests involved the *in vitro* hydrolysis of α_{s1} - and β -caseins, in a set-up which mimicked conditions in cheese and allowed adjusting such parameters as pH and salt content. Then, small Emmental-like cheeses were produced with the strains which had demonstrated the highest proteolytic activity.

Our results tend to show that *L. helveticus* does not differ much from other lactic acid bacteria. Indeed, even if some *L. helveticus* strains may have up to four CEPs, it seems that PrtH3 is the only one having a strong activity on bovine casein. *In vitro* experiments showed that strains with the highest proteolytic activity preferentially breakdown β -casein and that the rate of breakdown of α_{s1} - and β -caseins is increased at a pH value of 5.2, i.e. the pH value of Emmental, as compared to a pH value of 7.5. As for the impact of the salt content on the proteolytic activity of the *L. helveticus* and *S. thermophilus* strains, both *in vitro* and *in situ*, differences observed were noticeable, mostly at concentrations above those found in Emmental (1.5% NaCl/moisture). Therefore, *in vitro* analysis showed that a two to three times higher salt concentration than the regular salt content of Emmental seemed to decrease proteolytic activity up to three times, depending on the strain. In cheese, a two-times increase in the salt content led to a 16% decrease in the amount of peptides produced.

Key words: Cell-envelope Proteinase, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus*, Proteolysis, Heterologous Expression, PrtH