

Expression protéique, protéome

Optimisation de la production de protéines hétérologues exportées chez *Lactococcus lactis* par inactivation de HtrA, son unique protéase de ménage de surface

Isabelle POQUET^{a*}, Alexander BOLOTIN^b, Alexandra GRUSS^a

^a Laboratoire de Génétique Appliquée – URLGA, INRA, Centre de Recherche de Jouy-en-Josas, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France

^b Laboratoire de Génétique Microbienne, INRA, Centre de Recherche de Jouy-en-Josas, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France

Abstract — **Optimising the production of heterologous exported proteins in *Lactococcus lactis* by inactivation of HtrA, the unique housekeeping surface protease.** The use of bacteria as cell factories to produce heterologous exported proteins is often limited by extra-cellular proteolysis. We constructed a *Lactococcus lactis* mutant strain in which recombinant or heterologous exported proteins are stable. A previously unknown membrane protease belonging to the HtrA/DegP family (HtrA_{L₁}) was first identified in *L. lactis* subsp. *lactis* strain IL1403. Inactivation of the chromosomal gene revealed that HtrA_{L₁} acts as a surface housekeeping protease by elimination of abnormal and/or misfolded proteins, and that HtrA_{L₁} is also responsible for the maturation of natural exported proteins, such as the *L. lactis* bacteriolysin, AcmA. From an applied point of view, the most important result of our study is that in the absence of HtrA_{L₁}, the extra-cellular proteolysis of all tested proteins, in particular an heterologous one, is completely abolished, and the yield of intact protein is significantly increased. These results suggest that HtrA_{L₁} is the sole extra-cellular housekeeping protease in *L. lactis*, in agreement with the analysis of the complete IL1403 genome sequence. In the future, the mutant *htrA* strain should constitute an efficient tool to improve yields of heterologous exported proteins in *L. lactis*.

***Lactococcus lactis* HtrA / extra-cellular proteolysis / extra-cellular protein stability / production of heterologous proteins**

Résumé — L'utilisation des bactéries comme usines cellulaires pour produire des protéines hétérologues exportées est souvent limitée par des problèmes de dégradation extracellulaire. Chez *Lactococcus lactis*, nous avons construit une souche mutante qui permet d'exporter des protéines recombinantes ou hétérologues sous une forme stable. Nous avons d'abord identifié dans la souche IL1403

* Correspondance et tirés-à-part
Tél. : (33) 1 34 65 20 74 ; fax : (33) 1 34 65 20 65 ; e-mail : poquet@biotec.jouy.inra.fr

de *L. lactis* subsp. *lactis* une protéase membranaire de la famille HtrA/DegP jusqu'alors inconnue (HtrA_{L1}). L'inactivation de son gène a ensuite montré qu'elle assure, à la surface cellulaire, une fonction de ménage en éliminant des protéines anormales et/ou mal repliées, et qu'elle est aussi responsable de la maturation de protéines exportées naturelles, comme la bactériolysine AcmA de *L. lactis*. D'un point de vue appliqué, le résultat majeur de notre étude est qu'en l'absence de HtrA_{L1}, la protéolyse de toutes les protéines exportées testées, dont en particulier une protéine hétérologue, est totalement abolie, et que le rendement en protéine intacte augmente significativement. Cela indique que HtrA_{L1} est l'unique protéase de ménage extracellulaire chez *L. lactis*, ce qui est en accord avec l'analyse du génome d'IL1403. À l'avenir, la souche mutante *htrA* de *L. lactis* devrait donc constituer un outil performant pour optimiser les rendements de production de protéines hétérologues exportées.

***Lactococcus lactis* HtrA / protéolyse extracellulaire / stabilité des protéines extracellulaires / production de protéines hétérologues**

1. INTRODUCTION

De nombreuses études appliquées utilisent les bactéries comme usines cellulaires pour la production de protéines hétérologues. L'exportation de ces protéines (transport à travers la membrane cytoplasmique aboutissant à une localisation dans l'enveloppe ou à la surface cellulaire, ou encore à la sécrétion dans le milieu) est particulièrement adaptée quand on les produit pour les purifier facilement, ou pour leur action spécifique sur des cibles extracellulaires. L'efficacité du processus global de production et d'exportation hétérologue est un paramètre prépondérant qui se mesure par le rendement en protéine utile, c'est-à-dire à la fois exportée, active et stable, par rapport à la protéine produite. Si on maîtrise aujourd'hui assez bien les outils génétiques et moléculaires pour faire produire et même exporter une protéine en quantité par une bactérie, les étapes tardives de repliement et de stabilité à la surface cellulaire restent limitantes. Même chez *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*, les stratégies développées pour inhiber la dégradation protéolytique pendant ou après l'exportation donnent souvent des résultats décevants [14, 27, 30] ; de plus, comme les caractéristiques de repliement d'une protéine ne peuvent pas être prédites, leur efficacité ne peut pas être évaluée a priori.

Notre laboratoire s'intéresse à un système alternatif de production et d'exportation de protéines hétérologues, basé sur *Lactococcus lactis*. *L. lactis* est le modèle des bactéries lactiques, qui sont des bactéries à Gram-positif non pathogènes, utilisées pour fabriquer divers aliments fermentés (fromages, yaourts, ...), et ingérées par le consommateur (statut alimentaire ou GRAS). L'exportation de protéines hétérologues par *L. lactis* a des applications potentielles diverses : dans le domaine des biotechnologies, des protéines à haute valeur ajoutée pourront être produites et facilement purifiées en fermenteur ; pour l'agroalimentaire, la production d'enzymes au sein d'un fromage pourrait accélérer son affinage ; et enfin, dans le domaine de la santé du consommateur, la production d'antigènes dans les produits fermentés pourrait stimuler le système immunitaire du consommateur et permettre de le vacciner. Dans ce cadre, nous avons développé des outils pour optimiser diverses étapes de l'exportation des protéines [8, 10, 18]. Nous disposons par exemple d'une collection de signaux d'expression génique et d'exportation protéique qui peuvent être fusionnés à la séquence codante d'une protéine hétérologue pour commander à la fois sa production et sa localisation extracellulaire [18]. De plus, récemment, nous avons inactivé une protéase de surface qui était jusqu'alors

inconnue, ce qui a permis de stabiliser totalement des protéines exportées, en particulier hétérologues [19].

2. LA PROTÉOLYSE EXTRACELLULAIRE CHEZ LES BACTÉRIES MODÈLES *E. COLI* ET *B. SUBTILIS*

2.1. Multiplicité des protéases exportées

Les bactéries modèles possèdent de nombreuses protéases exportées. En dehors des peptidases spécifiques de l'exportation, impliquées dans le clivage des peptides signaux des protéines exportées, *E. coli* et *B. subtilis* possèdent respectivement 9 (HtrA/DegP, DegQ/HhoA et DegS/HhoB, OmpT, OmpP, Prc/Tsp, SppA/protéase IV, PrtIII, SohB, toutes dans l'enveloppe [6]) et 11 (4 dans l'enveloppe : YxA, Ykda, YvtA, WprA [13, 16], et 7 sécrétées : la subtilisine ou protéase alcaline Apr, la métallo-protéase neutre majeure NprE, la bacillo-peptidase F ou Bpf, la métallo-protéase mineure Mpr, la protéase à sérine Epr, la métallo-protéase neutre mineure ou NprB, et la protéase à sérine Vpr [17]) protéases exportées. Bien que leurs rôles ne soient pas toujours connus précisément, on peut penser qu'elles participent aux fonctions extracytoplasmiques suivantes : (i) la nutrition azotée et la croissance, par la fourniture de peptides et d'acides aminés assimilables, (ii) le renouvellement et le recyclage des protéines exportées et (iii) la fonction « de ménage » dans l'enveloppe, qui permet de se débarrasser des protéines exportées anormales ou mal repliées (des formes protéiques tronquées par un arrêt prématuré de traduction, des agrégats inactifs qui peuvent s'accumuler de façon toxique dans certaines conditions de stress...). De même, les protéines hétérologues, qui sont probablement peu ou mal reconnues par les chaperons et les catalyseurs de repliement de la bactérie productrice, peuvent présenter des problèmes de repliement et constituent en général des

cibles privilégiées pour les protéases de ménage.

2.2. La protéase de ménage exportée la plus étudiée, HtrA d'*E. coli*

La protéase de ménage exportée la plus étudiée est la protéase à sérine périplasmique DegP/HtrA d'*E. coli* [16]. Son gène a d'abord été identifié comme nécessaire à la dégradation de protéines recombinantes (fusions entre des protéines exportées d'*E. coli* et la phosphatase alcaline, PhoA, utilisée comme rapporteur [24]), puis comme essentiel à la survie à très haute température (> 42 °C), et induit dans cette condition [11, 12]. Ces 2 approches ont permis d'élaborer le modèle de la fonction de ménage de HtrA : elle dégrade des protéines exportées anormales, comme des protéines de fusion, ou des protéines dénaturées à très haute température et susceptibles de former des agrégats toxiques [12, 16, 24]. Il a été montré récemment qu'elle peut avoir 2 activités antagonistes selon la température : protéase à température élevée ou normale, et chaperon à basse température [22].

HtrA joue une fonction probablement vitale parce que sa séquence est très conservée chez de nombreux organismes procaryotes ou eucaryotes, et que plusieurs copies de HtrA sont souvent présentes au sein d'une même espèce bactérienne : 3 chez *E. coli* (les protéines HtrA/DegP, DegQ/HhoA et DegS/HhoB sont homologues entre elles et exportées [16]) et 3 chez *B. subtilis* (YxA/YycK, Ykda/HtrA et YvtA sont homologues à HtrA d'*E. coli*, et elles possèdent un domaine transmembranaire potentiel [16]).

2.3. Diverses protéases exportées ont un rôle de ménage

L'étude de HtrA d'*E. coli* indique que ce n'est pas la seule protéase de ménage de l'enveloppe chez cette bactérie. Dans la souche mutante *htrA* d'*E. coli*, les fusions à

PhoA exportées sont toujours dégradées, mais plus lentement que dans la souche sauvage, et cela par les autres protéases exportées [24]. De même, chez *B. subtilis*, c'est l'inactivation des protéases sécrétées majeures (Apr, NprE et Bpf) qui a permis la détection, dans le milieu de culture, des protéases mineures, et leur caractérisation [17]. Il existe une autre indication expérimentale du rôle de ménage de plusieurs protéases exportées d'*E. coli*. Lorsqu'ils sont présents en multicopie, les gènes *hhoA* et *sohB* d'une part, et *hhoA* et *hhoB* d'autre part, sont des suppresseurs du phénotype léthal conditionnel de mutants nuls *htrA* [1, 26] et *prc* [2] respectivement. Ainsi, plusieurs protéases exportées d'*E. coli* ou de *B. subtilis*, peuvent, au moins dans certaines conditions, se substituer les unes aux autres, et jouer un rôle de ménage dans l'enveloppe.

2.4. Systèmes de production de protéines exportées hétérologues : optimisation et limites

Au vu de la multiplicité des protéases exportées, la stratégie pour optimiser l'exportation de protéines hétérologues a souvent consisté à combiner des mutations affectant plusieurs protéases différentes. Ainsi, des séries de souches d'*E. coli* ou de *B. subtilis* ont été construites en mutant successivement plusieurs gènes de protéases exportées, respectivement les 4 gènes *degP/htrA, ompT, prt* et *prc* [14], ou les 7 gènes *aprA, nprE, bpf, mpr, epr, nprB* et *vpr* [30]. Par exemple, les souches de *B. subtilis* WB600 et WB700, déficientes pour 6 des protéases sécrétées ou pour les 7, ont respectivement permis de produire, sous des formes fonctionnelles, l'anticorps anti-digoxine à simple chaîne [28] et la staphylokinase [30].

Mais l'utilisation des souches d'*E. coli* ou de *B. subtilis* déficientes en protéases exportées présente 2 limites importantes. (i) D'abord, la croissance de ces souches est souvent d'autant plus ralentie que le

nombre de mutations est grand, et ce défaut se répercute au niveau du rendement en protéine obtenu. Par exemple, chez *E. coli*, le quadruple mutant *degP/htrA, ompT, prt* et *prc* a une croissance environ 2 fois plus faible que la souche parentale à 30 °C (la valeur à 37 °C, non déterminée, pourrait être encore plus faible [14]). (ii) Ensuite, la stabilité n'est pas toujours améliorée de façon significative à cause des protéases exportées encore présentes. Par exemple, chez *B. subtilis*, dans la souche WB600 où 6 protéases sécrétées sont inactives, l'activité protéolytique extracellulaire résiduelle est de 0,3 % [27]. Le système de production de l'anticorps anti-digoxine à simple chaîne, initialement basé sur la souche WB600 [28], a été amélioré par la surproduction concomitante de chaperons à la fois cytoplasmiques et extracytoplasmiques [29]. En parallèle, la souche WB700 déficiente pour toutes les 7 protéases sécrétées a été développée, et elle permet de produire à fort rendement la staphylokinase [30]. Mais il a été montré que la staphylokinase est sensible à la dégradation par la protéase de l'enveloppe WprA [9], et que l'activité protéolytique extracellulaire résiduelle de WB700 est de 0,1 % [30], probablement à cause à la fois de WprA et des 3 protéases potentielles de la famille HtrA [13, 16].

Finalement, bien que les souches d'*E. coli* et de *B. subtilis* déficientes en protéases exportées constituent la base de systèmes de production hétérologue utilisés avec succès dans certains cas, leur efficacité n'est pas optimale, du fait de la persistance de protéases exportées, et de problèmes de croissance.

3. LA PROTÉOLYSE EXTRACELLULAIRE CHEZ *L. LACTIS*

3.1. La protéolyse de surface chez *L. lactis* et le rôle de PrtP

Chez *L. lactis*, qui est notamment utilisé pour fabriquer des fromages, la protéolyse

joue un rôle clé dans les applications en technologie fromagère, par son impact à la fois sur la croissance bactérienne, et sur la qualité aromatique des produits fermentés. *L. lactis* possède un système protéolytique complexe composé de multiples peptidases intracellulaires et d'une seule protéase ancrée à la surface cellulaire, PrtP. PrtP, dont le gène est plasmidique, est une protéase à sérine qui permet la croissance dans le lait en dégradant les caséines [7].

PrtP a souvent été présentée comme la seule protéase de surface chez *L. lactis*, à cause de son rôle primordial dans la nutrition azotée, et de l'échec de tentatives de purification d'autres protéases de surface (notons que la protéase membranaire HflB de *L. lactis* a son site catalytique dans le cytoplasme [15]). Mais certaines souches de *L. lactis* possèdent une protéase de surface spécifique de la maturation du précurseur de la nisine [25]. De plus, il existe des protéases de surface différentes de PrtP chez d'autres bactéries lactiques : *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* possède une métallo-protéase de surface [23], et *Lb. helveticus* a un homologue de HtrA, dont le gène est inductible en condition de stress, et qui présente un signal d'exportation [21]. Récemment, nous avons mis en évidence l'existence d'une protéine exportée de la famille HtrA chez *L. lactis*, et nous avons montré que c'est une protéase fonctionnelle [19].

3.2. Découverte d'une nouvelle protéase de surface, HtrA_{L1}

Nous avons émis l'hypothèse que *L. lactis* devait posséder au moins une nouvelle protéase exportée à la suite de la mise en évidence de la protéolyse extracellulaire de protéines de fusion au rapporteur $\Delta_{SP}Nuc$ [18]. Ce rapporteur dérive de la nucléase Nuc de *Staphylococcus aureus* par une délétion N-terminale englobant le peptide signal, et il ne présente d'activité nucléasique qu'à l'extérieur de la cellule. Il a été développé

pour permettre, chez les bactéries à Gram-positif, d'identifier spécifiquement les gènes de protéines exportées sous la forme des fusions traductionnelles qui présentent l'activité nucléasique [18]. En utilisant $\Delta_{SP}Nuc$ dans la souche MG1363 de *L. lactis* subsp. *cremoris*, nous avons mis en évidence seize gènes de protéines exportées [18]. Dans MG1363 (dépourvue de PrtP), les protéines de fusion à $\Delta_{SP}Nuc$ se sont souvent révélées la cible d'une protéolyse extracellulaire de nature inconnue [18].

Nous avons pensé que cette protéolyse pourrait relever de la fonction de ménage, et être due à un homologue de HtrA d'*E. coli*, qui dégrade des protéines recombinantes du même type (des fusions entre des protéines exportées et un rapporteur [24]). Dans le génome complet de la souche de *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 [3], nous n'avons trouvé qu'un seul cadre de lecture homologue à HtrA d'*E. coli*, et nous l'avons appelé HtrA_{L1}.

3.3. Caractérisation de HtrA_{L1} et obtention de la souche mutante *htrA*

HtrA_{L1} (408 acides aminés) est l'homologue de HtrA, HhoA et HhoB d'*E. coli* (34 % d'identité), d'YyxA et YkdA de *B. subtilis* (45 et 46 % d'identité respectivement), et de HtrA de *Lb. helveticus* (47 % d'identité). Elle a toutes les propriétés d'une protéase à sérine de la famille HtrA [19]. D'abord, elle possède la triade catalytique sérine, histidine et aspartate (en position 239, 127 et 157 respectivement) dans 3 régions consensus qui caractérisent cette famille (DAYVVTNYH₁₂₇VI, D₁₅₇LAVLKIS, et GNS₂₃₉GGALINIEGQVIGIT, les acides aminés conservés apparaissant en gras [16]). Ensuite, elle possède un domaine N-terminal hydrophobe, prédit pour être transmembranaire (L₉LLTGVVGGAIALGG-SAI₂₆). Cela suggère que HtrA_{L1} est une protéine membranaire avec son site catalytique potentiel exposé à la surface, et donc

capable de dégrader des protéines exportées [19]. Enfin, elle possède à son extrémité C-terminale un domaine de type PDZ, connu pour intervenir dans les interactions protéines-protéines, et qui pourrait être impliqué dans la fixation au substrat ou dans l'oligomérisation de la protéine [16].

Pour analyser le rôle de HtrA_{LI}, nous avons inactivé spécifiquement son gène (*htrA_{LI}*) par un évènement simple de recombinaison homologue [19]. Dans la souche IL1403, *htrA_{LI}* a été interrompu par l'insertion d'un plasmide qui confère la résistance au chloramphénicol (Cm^R, la souche correspondante est appelée *htrA*) ; en parallèle, une copie sauvage de *htrA_{LI}* a aussi été maintenue malgré l'insertion du même plasmide (la souche Cm^R correspondante est appelée *htrA⁺/htrA*). Nous avons alors testé les phénotypes de croissance et de protéolyse de surface des 3 souches isogéniques IL1403, *htrA⁺/htrA* et *htrA*.

3.4. La fonction de ménage de HtrA_{LI}

3.4.1. Son rôle dans la croissance et la survie à haute température

Les propriétés de croissance de la souche *htrA* ont été comparées à celles des 2 souches isogéniques IL1403 et *htrA⁺/htrA*. À la température optimale de 30 °C, en culture liquide, les 3 souches présentent des croissances comparables (indépendamment de la présence ou non de sélection par le Cm pour les 2 souches Cm^R, *htrA⁺/htrA* et *htrA*). Ainsi, à 30 °C, la croissance de la souche *htrA* est normale en milieu liquide ; en milieu solide, cette souche présente des colonies très petites, parmi lesquelles quelques gros clones sensibles au chloramphénicol (Cm^S), probablement des révertants sauvages (ayant perdu l'insert dans le gène *htrA_{LI}*) peuvent apparaître [19].

À partir de 37 °C, à la fois en milieux liquide et solide, la souche *htrA* présente un défaut de croissance et de viabilité par rapport aux 2 souches isogéniques. Un saut de température de 30 °C à 39 °C appliqué à

une culture liquide en phase exponentielle aboutit à : (i) un arrêt de croissance uniquement de la souche *htrA*, et à un ralentissement de la croissance des 2 autres souches, et (ii) à une chute de viabilité après 5 h d'exposition à 39 °C dix fois plus importante pour la souche *htrA* que pour les 2 autres souches [19].

La thermo-sensibilité de la souche *htrA* démontre que la protéine HtrA_{LI} est impliquée dans la résistance au choc thermique et qu'elle est essentielle pour la survie à haute température. Cela suggère que HtrA_{LI} aurait un rôle d'élimination des protéines exportées dénaturées et toxiques.

3.4.2. Le rôle de HtrA_{LI} dans la protéolyse de protéines anormales

Nous avons analysé la protéolyse de surface de protéines de fusion exportées chez la souche *htrA*. Trois fusions à Δ_{SP}Nuc ont été choisies dans notre collection du fait de l'importance de leur protéolyse extracellulaire dans un contexte *htrA* sauvage, et de leurs différentes localisations [18] : la fusion sécrétée Usp45-Δ_{SP}Nuc, la lipoprotéine Nlp4-Δ_{SP}Nuc et la fusion complexe exportée Exp5-Δ_{SP}Nuc. Dans ces fusions, la partie N-terminale provient des protéines suivantes : (i) Usp45, la majeure protéine sécrétée dans le milieu de culture de *L. lactis*, (ii) Nlp4, une lipoprotéine ancrée à la membrane cytoplasmique de *L. lactis* par ses acide gras, et (iii) une fusion entre deux protéines de *L. lactis*, une protéine de paroi (« penicillin binding protein » qui possède un peptide signal) et une protéine cytoplasmique (Exp5-Δ_{SP}Nuc est donc tripartite et exportée) [18].

Pour pouvoir comparer le comportement de chacune des 3 fusions dans les souches IL1403, *htrA⁺/htrA* ou *htrA* [19], nous les avons repérées par une immuno-détection. Pour cela, nous avons utilisé des anticorps dirigés contre la protéine purifiée NucA, qui est la forme obtenue par clivage du propeptide de la nucléase sauvage Nuc de *S. aureus*.

En effet, NucA correspond à la partie C-terminale de $\Delta_{\text{Sp}}\text{Nuc}$ (dans lequel la majorité du propeptide de Nuc est délétée, sauf les 6 derniers acides aminés, et qui contient donc le site de clivage permettant de libérer NucA). Les anticorps anti-NucA permettent donc de révéler des fragments C-terminaux des fusions qui contiennent la partie NucA.

Dans les souches IL1403 et *htrA*⁺/*htrA*, les 3 fusions Usp45- $\Delta_{\text{Sp}}\text{Nuc}$, Nlp4- $\Delta_{\text{Sp}}\text{Nuc}$ et Exp5- $\Delta_{\text{Sp}}\text{Nuc}$ sont fortement dégradées (Fig. 1). Pour Usp45- $\Delta_{\text{Sp}}\text{Nuc}$ et Nlp4- $\Delta_{\text{Sp}}\text{Nuc}$, on détecte un produit de dégradation NucA obtenu par clivage dans $\Delta_{\text{Sp}}\text{Nuc}$. Le fractionnement cellulaire montre que le produit NucA de dégradation d'Usp- $\Delta_{\text{Sp}}\text{Nuc}$ est partiellement libéré dans le milieu de culture, ce qui indique que la protéolyse s'effectue à un niveau extracellulaire. Pour Exp5- $\Delta_{\text{Sp}}\text{Nuc}$, ses formes, et en particulier NucA, ne sont que difficilement détectables, ce qui reflète une dégradation extrêmement importante, voire totale.

Dans la souche *htrA*, les 3 fusions sont stables (Fig. 1) : on ne détecte plus du tout les produits de dégradation NucA, et leur disparition s'accompagne de l'augmentation concomitante de la quantité des formes intactes. Cette stabilisation est particulièrement spectaculaire dans le cas d'Exp5- $\Delta_{\text{Sp}}\text{Nuc}$, dont la forme intacte n'est présente en quantité que dans la souche *htrA* (Fig. 1). Ces résultats démontrent que HtrA_{LI} est entièrement responsable de la dégradation extracellulaire des 3 protéines de fusion à $\Delta_{\text{Sp}}\text{Nuc}$ testées [19].

Il est intéressant de noter que, parmi elles, seule Exp5- $\Delta_{\text{Sp}}\text{Nuc}$ ne présente pas d'activité nucléasique dans le contexte *htrA*. Cela indique que la partie rapporteur de la forme Exp5- $\Delta_{\text{Sp}}\text{Nuc}$ entière est incapable d'adopter sa conformation active. Le caractère aberrant du repliement d'Exp5- $\Delta_{\text{Sp}}\text{Nuc}$ doit être rapproché de l'intensité de sa dégradation par HtrA_{LI} dans la souche sauvage, et de la nature complexe et totalement non physiologique de cette fusion tripartite qui permet

l'exportation d'un fragment de protéine cytoplasmique. Cette étude montre que HtrA_{LI} est capable de reconnaître et de dégrader une protéine exportée de conformation anormale.

Par ailleurs, nous avons aussi montré que HtrA_{LI} est totalement responsable de la dégradation d'une protéine hétérologue sécrétée, la lipase de *Staphylococcus hyicus*. L'ensemble de nos résultats montrent que HtrA_{LI} assure une fonction de ménage en dégradant diverses protéines anormales, recombinantes ou hétérologues [19]. Dans le cadre d'une production à visée appliquée, la souche *htrA* devrait donc constituer un outil très utile pour stabiliser des protéines hétérologues.

3.5. Le rôle de HtrA_{LI} dans la maturation de protéines naturelles

Nous avons étudié l'effet de l'inactivation de *htrA*_{LI} sur 2 protéines exportées particulières, la nucléase Nuc de *S. aureus* [20], et la bactériolysine AcmA de *L. lactis* [4], qui sont connues pour subir, dans la souche MG1363, une maturation (un clivage spécifique) par une protéase inconnue [4, 10].

Nuc possède à la fois un peptide signal et un pro-peptide : après le clivage du premier, elle subit une maturation secondaire du second pour donner la forme NucA, non seulement chez *S. aureus* [20], mais aussi chez divers hôtes hétérologues dont *L. lactis* [9]. Nous avons montré que, chez *L. lactis*, HtrA_{LI} est responsable de la maturation du pro-peptide de Nuc [19]. Notons que celui-ci a une structure de bras flexible, et ce repliement particulier pourrait être à l'origine de sa reconnaissance par HtrA_{LI}. Nous proposons que HtrA_{LI} soit impliquée dans la maturation de protéines exportées de *L. lactis* ayant un pro-peptide, et que chez *S. aureus*, un homologue de HtrA soit responsable du clivage du pro-peptide de Nuc.

AcmA de *L. lactis* est une muramidase qui peut provoquer la lyse (autolyse ou lyse

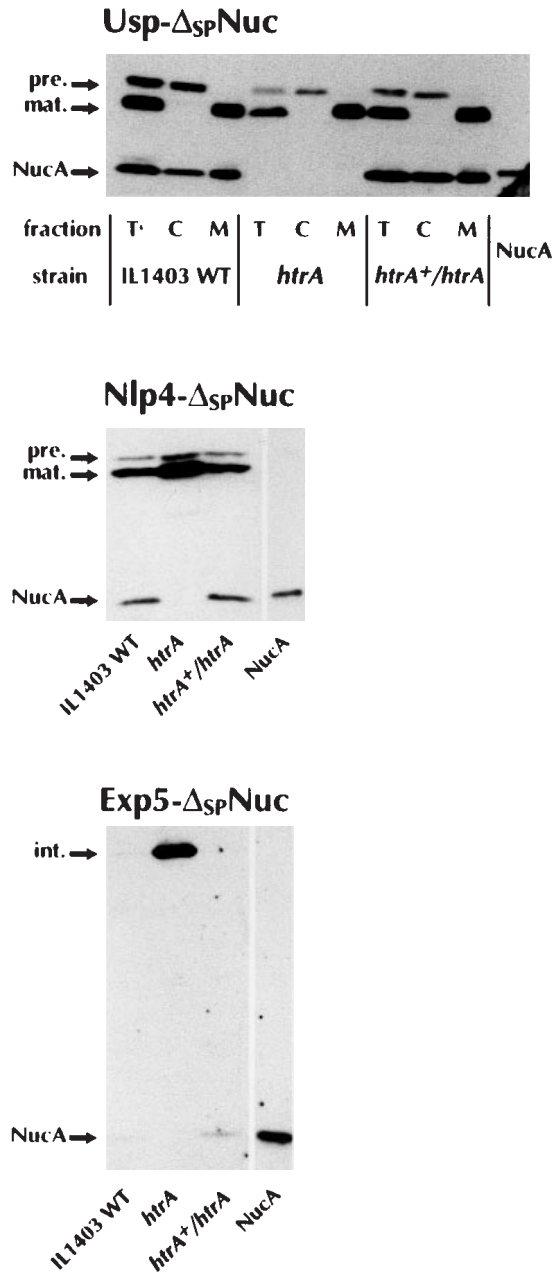


Figure 1. Immuno-détection des protéines de fusion à Δ_{Sp} Nuc dans les contextes *htrA* sauvage ou mutant. Des souches dérivées d'IL1403, de *htrA*⁺/*htrA* ou de *htrA* et qui produisent Usp- Δ_{Sp} Nuc (en haut), Nlp4- Δ_{Sp} Nuc (au milieu), ou Exp5- Δ_{Sp} Nuc (en bas), ont été cultivées jusqu'en phase exponentielle tardive (DO_{600} 0,6–0,8), et des extraits protéiques de culture ont été soumis à une électrophorèse SDS-PAGE, suivie d'une immuno-détection avec des anticorps polyclonaux dirigés contre

par les cellules en présence), et qui possède un peptide signal et 3 répétitions C-terminales : après le clivage du premier, AcmA subit une maturation secondaire, probablement au niveau des répétitions, qui libère 2 formes actives [4]. Nous avons montré que, chez *L. lactis*, HtrA_{LI} est nécessaire et suffisante pour la maturation d'AcmA en formes actives [19] ; PrtP n'est pas nécessaire à cette maturation même si elle y contribue dans les souches qui la possèdent [5].

L'ensemble de ces résultats met en évidence une nouvelle fonction pour la protéase HtrA : la maturation spécifique de protéines exportées naturelles. HtrA pourrait reconnaître des conformations particulières au sein de ces protéines exportées pour effectuer leur maturation, et leur conférer de nouvelles propriétés (localisation, activité...). HtrA pourrait ainsi participer à d'autres fonctions que celle de ménage, comme la virulence chez les pathogènes (Nuc est un facteur de virulence de *S. aureus*), ou la régulation écologique des populations en compétition dans le milieu (la bactériolytine AcmA est active contre d'autres espèces que *L. lactis*, comme les microcoques [4]) [19].

3.6. HtrA_{LI} est l'unique protéase de ménage de surface chez *L. lactis*

Dans tous les cas que nous avons étudiés jusqu'à présent, nous avons montré que HtrA_{LI} est entièrement responsable de la protéolyse des protéines testées, qu'il s'agisse de la dégradation des protéines de fusion ou hétérologues, ou de la maturation des protéines naturelles (voir 3.4.2., 3.5. et Fig. 1). En effet, dans la souche *htrA*, l'intégralité des produits de protéolyse disparaissent : l'effet de stabilisation des protéines est donc total, ce qui est tout à fait remarquable par rapport au ralentissement de la protéolyse obtenu dans la souche *htrA* d'*E. coli* [24]. Cela indique que dans la souche IL1403 de *L. lactis*, HtrA_{LI} est la seule et unique protéase de surface [19].

Ces résultats expérimentaux sont confirmés par l'analyse du génome [3] : il n'existe qu'une seule protéase de ménage exportée, non seulement de la famille HtrA (et cela contrairement à de nombreuses autres espèces bactériennes [16]), mais aussi d'autres familles. En particulier, il n'existe pas d'homologues des protéases exportées d'une autre famille que HtrA, que ce soit

la protéine NucA purifiée. Pour Usp- Δ_{sp} Nuc, un fractionnement a été réalisé, et les cellules, ou le milieu de culture, ou encore la fraction totale (cellules et milieu) sont notés respectivement C, M ou T. Pour les 2 autres fusions, seule la fraction totale a été étudiée. La protéine NucA purifiée a été déposée comme contrôle positif dans la piste de droite de chaque gel. On détecte diverses formes protéiques : (i) pre. est le précurseur potentiel d'Usp- Δ_{sp} Nuc ou de Nlp4- Δ_{sp} Nuc ; (ii) mat. est la forme mature potentielle obtenue par clivage du peptide signal d'Usp- Δ_{sp} Nuc ou de Nlp4- Δ_{sp} Nuc ; (iii) int. est la forme intacte d'Exp5- Δ_{sp} Nuc (probablement la forme mature après clivage du peptide signal) et (iv) NucA est le produit de dégradation qui comigre avec la protéine purifiée NucA. Reproduit avec la permission de Blackwell Science.

Figure 1. Western blotting of Δ_{sp} Nuc fusion proteins in wild-type and mutant *htrA* contexts. IL1403, *htrA* and *htrA*⁺/*htrA* strains expressing Usp- Δ_{sp} Nuc (top), Nlp4- Δ_{sp} Nuc (middle), or Exp5- Δ_{sp} Nuc (bottom) were submitted to SDS-PAGE and Western Blotting using polyclonal antibodies against purified NucA. For Usp- Δ_{sp} Nuc protein extracts were fractionated: T, total fraction (cells plus media), C, cells fraction and M, medium fraction. For Nlp4- Δ_{sp} Nuc and Exp5- Δ_{sp} Nuc, only total fraction was studied. For each panel, purified NucA control is in the right-hand lane. Several bands can be detected: (i) pre. is the putative precursor of Usp- Δ_{sp} Nuc or Nlp4- Δ_{sp} Nuc; (ii) mat. is the putative mature form of Usp- Δ_{sp} Nuc or Nlp4- Δ_{sp} Nuc, obtained after signal peptide cleavage; (iii) int. is the putative intact form of Exp5- Δ_{sp} Nuc (probably the mature form after signal peptide cleavage); and (iv) NucA is the NucA-size degradation product. Reproduced with the permission of Blackwell Science.

celles d'*E. coli* OmpT, OmpP, Prc/Tsp, SppA/protéase IV, PrtIII et SohB [6]), ou de *B. subtilis* (WprA, Apr, NprE, Bpf, Mpr, Epr, NprB, et Vpr [13, 16, 17]).

Nous proposons que dans le génome de taille faible de *L. lactis* (2,5 Mb), l'information génétique de la protéolyse de ménage de surface ait été minimisée au cours de l'évolution et réduite à un seul gène, celui de HtrA_{LI}. Ce pourrait aussi être le cas chez d'autres bactéries à Gram-positif à petit génome [19].

4. CONCLUSION SUR L'INTÉRÊT DE LA SOUCHE *htrA* DE *L. LACTIS* POUR PRODUIRE DES PROTÉINES HÉTÉROLOGUES EXPORTÉES

La mise en évidence de l'unicité de HtrA_{LI} en tant que protéase de ménage de surface chez *L. lactis* est particulièrement intéressante d'un point de vue appliqué. En effet, la mutation unique du gène *htrA_{LI}* chez *L. lactis* permet de stabiliser totalement les protéines exportées en particulier hétérologues, tout en conservant des propriétés de croissance intactes à la température optimale de 30 °C. Ainsi, un système de production hétérologue basé sur la souche mutante *htrA* de *L. lactis* devrait, contrairement à ceux disponibles chez *E. coli* et *B. subtilis*, concilier des exigences de biomasse cellulaire et de stabilité protéique, et donc aboutir à optimiser les rendements obtenus. Nous pensons que, grâce à ce système, des applications dans le domaine des biotechnologies, et en particulier la production efficace de protéines hétérologues exportées à haute valeur ajoutée, pourront être développées.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Blackwell Science pour l'autorisation de reproduire une figure de l'article publié dans *Molecular Microbiology* 35 (2000) 1042–1051. Nous exprimons notre reconnaissance à C. Foucaud pour avoir relu cet article.

RÉFÉRENCES

- [1] Baird L., Lipinska B., Raina S., Georgopoulos C., Identification of the *Escherichia coli* *sohB* gene, a multicopy suppressor of the HtrA (DegP) null phenotype, *J. Bacteriol.* 173 (1989) 5763–5770.
- [2] Bass S., Gu Q., Christen A., Multicopy suppressors of Prc mutant *Escherichia coli* include two HtrA (DegP) protease homologs (HhoAB), DksA and a truncated RlpA, *J. Bacteriol.* 178 (1996) 1154–1161.
- [3] Bolotin A., Mauger S., Malarme K., Ehrlich S.D., Sorokin A., Low-redundancy sequencing of the entire *Lactococcus lactis* IL1403 genome, *Antonie van Leeuwenhoek* 76 (1999) 27–76.
- [4] Buist G., Kok J., Leenhouts K.J., Dabrowska M., Venema G., Haandrikman A.J., Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the major peptidoglycan hydrolase of *Lactococcus lactis*, a muramidase needed for cell separation, *J. Bacteriol.* 177 (1995) 1554–1563.
- [5] Buist G., Venema G., Kok J., Autolysis of *Lactococcus lactis* is influenced by proteolysis, *J. Bacteriol.* 180 (1998) 5947–5953.
- [6] Gottesman S., Proteases and their targets in *Escherichia coli*, *Annu. Rev. Genet.* 30 (1996) 465–506.
- [7] Kunji E.R.S., Mierau I., Hagting A., Poolman B., Konings W.N., The proteolytic systems of lactic acid bacteria, *Antonie van Leeuwenhoek* 70 (1996) 187–221.
- [8] Langella P., Le Loir Y., Piard J.-C., Poquet I., Gruss A., Exportation de protéines hétérologues chez *Lactococcus lactis* : développement d'outils moléculaires et applications, *Sci. Aliments* 20 (2000) 135–142.
- [9] Lee S.J., Kim D.M., Bae K.H., Byun S.M., Chung J.H., Enhancement of secretion and extracellular stability of staphylokinase in *Bacillus subtilis* by *wprA* gene disruption, *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 476–480.
- [10] Le Loir Y., Gruss A., Ehrlich S.D., Langella P., A nine-residue synthetic propeptide enhances secretion efficiency of heterologous proteins in *Lactococcus lactis*, *J. Bacteriol.* 180 (1998) 1895–1903.
- [11] Lipinska B., Sharma S., Georgopoulos C., Sequence analysis and regulation of the *htrA* gene of *Escherichia coli*: a σ^{32} -independent mechanism of heat-inducible transcription, *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 10053–10067.
- [12] Lipinska B., Zylicz M., Georgopoulos C., The HtrA (DegP) protein, essential for *Escherichia coli* survival at high temperatures, is an endopeptidase, *J. Bacteriol.* 172 (1990) 1791–1797.
- [13] Margot P., Karamata D., The *wprA* gene of *Bacillus subtilis* 168, expressed during exponential growth, encodes a cell-wall-associated protease, *Microbiology* 142 (1996) 3437–3444.

- [14] Meerman H.J., Georgiou G., Construction and characterization of a set of *E. coli* strains deficient in all known loci affecting the proteolytic stability of secreted recombinant proteins, *Biotechnology* 12 (1994) 1107–1110.
- [15] Nilsson D., Lauridsen A.A., Tomoyasu T., Ogura T., A *Lactococcus lactis* gene encodes a membrane protein with putative ATPase activity that is homologous to the essential *Escherichia coli* *ftsH* gene product, *Microbiology* 140 (1994) 2601–2610.
- [16] Pallen M.J., Wren B.W., The HtrA family of serine proteases, *Mol. Microbiol.* 26 (1997) 209–221.
- [17] Pero J., Sloma A., Proteases, in: Sonenshein A.L., Hoch J.A., Losick R. (Eds.), *Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria*, ASM, Washington, USA, 1993, pp. 939–952.
- [18] Poquet I., Ehrlich S.D., Gruss A., An export-specific reporter designed for Gram-positive bacteria: application to *Lactococcus lactis*, *J. Bacteriol.* 180 (1998) 1904–1912.
- [19] Poquet I., Saint V., Seznec E., Simoes N., Bolotin A., Gruss A., HtrA is the unique surface housekeeping protease in *Lactococcus lactis* and is required for natural protein processing, *Mol. Microbiol.* 35 (2000) 1042–1051.
- [20] Shortle D., A genetic system for analysis of staphylococcal nuclease, *Gene* 22 (1983) 181–189.
- [21] Smeds A., Varmanen P., Palva A., Molecular characterization of a stress-inducible gene from *Lactobacillus helveticus*, *J. Bacteriol.* 180 (1998) 6148–6153.
- [22] Spiess C., Beil A., Ehrmann M., A temperature-dependant switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein, *Cell* 97 (1999) 339–347.
- [23] Stefanitsi D., Garel J.-R., A zinc-dependent proteinase from the cell wall of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lett. Appl. Microbiol.* 24 (1997) 180–184.
- [24] Strauch K.L., Beckwith J., An *Escherichia coli* mutation preventing degradation of abnormal periplasmic proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 1576–1580.
- [25] van der Meer J.R., Polman J., Beerthuyzen M.M., Siezen R.J., Kuipers O.P., de Vos W.M., Characterization of the *Lactococcus lactis* nisin A operon genes *nisP*, encoding a subtilisin-like serine protease involved in precursor processing, and *nisR*, encoding a regulatory protein involved in nisin biosynthesis, *J. Bacteriol.* 175 (1993) 2578–2588.
- [26] Waller P.R.H., Sauer R.T., Characterization of *degQ* and *degS*, *Escherichia coli* genes encoding homologs of the DegP protease, *J. Bacteriol.* 178 (1996) 1146–1153.
- [27] Wu X.-C., Lee W., Tran L., Wong S.-L., Engineering a *Bacillus subtilis* expression-secretion system with a strain deficient in six extracellular proteases, *J. Bacteriol.* 173 (1991) 4952–4958.
- [28] Wu X.-C., NG S.-C., Near R. H., Wong S.-L., Efficient production of a functional single-chain antidigoxin antibody via an engineered *Bacillus subtilis* expression-secretion system, *Biotechnology* 11 (1993) 71–76.
- [29] Wu S.-C., Ye R., Wu X.-C., NG S.-C., Wong S.L., Enhanced secretory production of a single-chain antibody fragment from *Bacillus subtilis* by co production of molecular chaperones, *J. Bacteriol.* 180 (1998) 2830–2835.
- [30] Ye R., Kim J.H., Kim B.G., Szarka S., Sihota E., Wong S.L., High-level secretory production of intact, biologically active staphylokinase from *Bacillus subtilis*, *Biotechnol. Bioeng.* 62 (1999) 87–96.