

Expression protéique, protéome

Caractérisation des facteurs d'hôtes affectant la sécrétion de protéines hétérologues chez *Lactococcus lactis*

Philippe LANGELLA, Sébastien NOUAILLE, Jacqueline COMMISSAIRE,
Alexander BOLOTINE, Alexandra GRUSS, Yves LE LOIR*

Génétique Appliquée, URLGA-INRA, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France

Abstract — Characterization of host factors affecting heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*. *Lactococcus lactis* is the model organism for Lactic Acid Bacteria (LAB) and is a GRAS bacterium. It is therefore a good candidate for the secretion of heterologous proteins of therapeutic interest. In order to investigate new potential uses for LAB, we study host factors involved in the production, the stability and/or the secretion of heterologous proteins in *L. lactis*. Our strategy uses a random insertional mutagenesis performed on a *L. lactis* MG1363 derivative strain carrying a *usp nuc* cassette in its chromosome. The *usp nuc* cassette encodes a hybrid precursor composed of the signal peptide of the Usp45 secreted protein and the staphylococcal nuclease (Nuc) which is used here as a reporter protein for the secretion process. Nuc activity of bacterial colonies is readily detectable in vivo and this provides an efficient screening for the selection of secretion mutants. We thus selected and analyzed six *L. lactis* mutants affected in Nuc secretion. Five out of the 6 corresponding genes were identified. Three of them seem to be involved in the production and/or secretion of proteins: 2 genes are homologous to unknown peptidases and one is homologous to a gene located downstream of a transcription regulator. Combination of different strategies should provide new insight of the secretion process in *L. lactis* and could result in the construction of secretion mutants with enhanced capacities.

Lactococcus lactis / secretion / heterologous protein / random mutagenesis

Résumé — *Lactococcus lactis*, bactérie lactique modèle, présente une parfaite innocuité hygiénique. Elle constitue, de ce fait, un bon candidat pour la sécrétion de protéines d'intérêt thérapeutique. Une partie de nos travaux dans ce domaine concerne la caractérisation des facteurs d'hôte impliqués dans la production, la stabilité et/ou la sécrétion de protéines hétérologues chez *L. lactis*. La stratégie employée consiste en une mutagenèse par transposition aléatoire sur le chromosome. Cette mutagenèse est menée sur une souche de *L. lactis* portant une cassette *usp nuc* intégrée sur le chromosome. La cassette *usp nuc* code pour un précurseur hybride composé du peptide signal d'Usp45, protéine

* Correspondance et tirés-à-part
Tél. : (33) 1 34 65 20 91 ; fax : (33) 1 34 65 20 65 ; e-mail : leloir@biotec.jouy.inra.fr

sécritée par *L. lactis*, et de la partie mature de la nucléase de *Staphylococcus aureus* (Nuc) utilisée ici comme protéine rapporteur de la sécrétion. L'activité de Nuc, facilement détectable in vivo sur les colonies bactériennes, constitue un crible efficace pour la sélection de mutants affectés dans la sécrétion. Six mutants de *L. lactis* affectés dans la sécrétion de Nuc ont ainsi été sélectionnés et analysés. Cinq des 6 gènes correspondants ont été identifiés. Trois semblent particulièrement impliqués dans la production et la sécrétion de protéines : 2 sont homologues à des gènes de peptidases inconnues et un est homologue à un gène situé dans une région potentiellement régulatrice d'un facteur de transcription. Différentes approches par mutagenèse devraient déboucher sur une meilleure connaissance de la machinerie de sécrétion de *L. lactis* et la construction de mutants hyperproducteurs ou hyper-sécréteurs.

***Lactococcus lactis* / sécrétion / protéine hétérologue / mutagenèse aléatoire**

1. INTRODUCTION

L'efficacité de sécrétion d'une protéine dépend de ses caractéristiques intrinsèques telles que son peptide signal (PS) et/ou sa structure, mais également de la capacité de l'organisme hôte à prendre en charge le précurseur. Chez les bactéries, différents systèmes interviennent pour assurer la sécrétion des protéines. Certains sont spécifiques d'une protéine (par exemple, couple bactériocine-transporteur ABC), d'autres prennent en charge une grande variété de précurseurs. C'est le cas de la voie générale de sécrétion (VGS) qui assure la sécrétion de la majorité des protéines sécrétées (caractérisées par un PS en position N-terminale du précurseur). Nous nous intéressons à la VGS de *Lactococcus lactis* dont peu d'éléments ont été identifiés, et ce, en dépit du séquençage du génome de *L. lactis* [1]. Dix-sept et 15 gènes de la VGS ont été identifiés respectivement chez *Escherichia coli* et chez *Bacillus subtilis* [8, 12]. L'analyse de la séquence du génome de *L. lactis* n'a permis l'identification que de 6 de ces facteurs : deux signal peptidases (qui clivent les PS des précurseurs), deux protéines de la machinerie de sécrétion (SecY, élément du Translocon, complexe assurant la translocation du précurseur à travers la membrane cytoplasmique et SecA qui pilote le précurseur vers le Translocon) et enfin, Ffh et FtsY (éléments du complexe chaperon qui

permettent l'arrimage du précurseur à la membrane et sa prise en charge par le Translocon). Du point de vue de la sécrétion de protéines, les lactocoques ne sécrètent en quantité détectable qu'une seule protéine, Usp45, de $45 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ et de fonction inconnue [15].

Pour une meilleure connaissance des facteurs d'hôtes impliqués dans la sécrétion, une approche par mutagenèse aléatoire a été initiée au laboratoire. Ces recherches auront pour conséquence, sur un plan cognitif, une meilleure connaissance des gènes impliqués dans la sécrétion de protéines chez *L. lactis*. Sur un plan appliqué, elles permettront la construction de mutants hypersécréteurs utilisables pour la production de protéines d'intérêt.

L'outil employé pour la mutagenèse par transposition aléatoire, pGhost:ISSI, est composé d'un plasmide à répllication thermosensible contenant une séquence d'insertion (ISSI, isolée de *L. lactis*) capable de s'insérer de manière aléatoire dans le chromosome [7].

L'identification de mutants altérés dans la sécrétion est effectuée à l'aide d'une protéine rapporteur de la sécrétion, la nucléase de *Staphylococcus aureus* (Nuc) [14]. Chez *S. aureus*, Nuc est synthétisée sous forme de précurseur (préNuc). Lors de la sécrétion, le PS_{Nuc} est clivé et deux formes sécrétées sont détectées : NucB ($18,8 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$) et NucA ($16,5 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$). NucA résulte du

clivage protéolytique du propeptide (19 résidus N-terminaux) de NucB. Les deux formes sécrétées, Nuc B et A, sont actives.

Le crible Nuc d'activité nucléolytique permet de détecter *in vivo* des colonies sécrétant plus ou moins Nuc [4–6]. Des mutants hypersécréteurs apparaîtront entourés d'un halo intense, et des mutants hyposécréteurs entourés d'un halo faible ou nul.

L'intégration de pGhost:ISS1 dans un gène aboutit dans la majorité des cas à l'inactivation du gène touché, mais elle peut également entraîner sa dérégulation. Cette mutagenèse par insertion aléatoire ne permet pas d'identifier des gènes essentiels. Par contre, elle permet une approche aléatoire et l'identification de gènes non essentiels impliqués dans la production, la stabilité, le repliement et/ou la sécrétion des protéines. Après sélection du mutant et identification du gène touché, ce système permet après excision du plasmide pGhost:ISS1 d'obtenir un excisant du mutant ne contenant plus que le gène interrompu par une ISS1.

Les résultats suivants ont été obtenus en combinant le crible Nuc et l'utilisation du pGhost :ISS1. La mutagenèse aléatoire a été menée sur la souche de *L. lactis* MG1363 [*uspNuc*] construite pour ce travail.

2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

2.1. Construction d'une souche de *L. lactis* modifiée pour la mutagenèse

Nous avons construit une souche de *L. lactis* MG1363 portant, sur son chromosome, une copie d'un gène hybride *uspNuc* constitué des signaux de transcription, traduction et sécrétion du gène *usp45* et du fragment d'ADN codant pour la partie mature de Nuc (NucB, [14]). Le produit de ce gène hybride est un précurseur, préUspNuc, composé du peptide signal d'Usp45 (PS_{Usp}) fusionné à NucB. Cette construction

a pour but de : (i) s'affranchir de l'utilisation de 2 plasmides et de 2 sélections antibiotiques lors de la mutagenèse (le système de mutagenèse aléatoire utilisé repose déjà sur un plasmide : pGhost:ISS1) et (ii) minimiser la sélection de faux mutants qui seraient affectés dans le nombre de copies du plasmide (portant la cassette *nuc*) plutôt que dans le processus de sécrétion lui-même. La cassette *uspNuc* a été intégrée sur le chromosome, au locus *his* (opéron de biosynthèse de l'histidine, inactif chez la souche MG1363 [3]) par un double crossing-over (Fig. 1). La construction a été contrôlée par analyse Southern et hybridation sur l'ADN chromosomique extrait de la souche. La sécrétion de Nuc a été analysée par Western blot et immunorévélation et l'efficacité de sécrétion (ES) de Nuc (i.e. le rapport entre les formes matures de Nuc sur la totalité des formes détectées) a été évaluée. Comme attendu au vu des résultats déjà obtenus avec des constructions plasmidiques (Le Loir et al., manuscrit en préparation), la souche MG1363[*uspNuc*] présente une ES optimale : l'ES est supérieure à 95 % et il n'y a pas de précurseur préUspNuc dans la fraction cellulaire. Dans le surnageant, NucB apparaît sous forme d'un doublet qui pourrait être attribué à un site de clivage alternatif de PS_{Usp}. La séquence protéique de préUspNuc a été soumise à une analyse prédictive des sites de clivage de peptides signaux (site Expasy tools, <http://www.expasy.ch/tools/>). Cette analyse ne révèle qu'un seul site de clivage du PS_{Usp}, et ne permet donc pas d'expliquer la présence du doublet. NucA, résultant d'un clivage protéolytique secondaire de NucB (élimination des 21 résidus N-terminaux), est minoritaire et détectée sous forme d'une seule bande dans le surnageant. Cette souche est donc appropriée pour l'identification de mutants hyposécréteurs (halo plus petit que celui de la souche parentale). Nous présenterons ici les premiers résultats obtenus lors d'une mutagenèse sur la souche MG1363 [*uspNuc*].

2.2. Identification de mutants altérés dans la sécrétion et confirmation des phénotypes Nuc

Une mutagenèse aléatoire a été menée sur la souche MG1363[*usp nuc*]. Environ

15000 mutants ont été criblés sur leur activité nucléolytique et 17 mutants présentent, in vivo, une sécrétion de Nuc affectée par rapport à la souche parentale. L'identification des 17 mutants par le crible « bleu/rose », basé sur la taille des halos, dépend de la

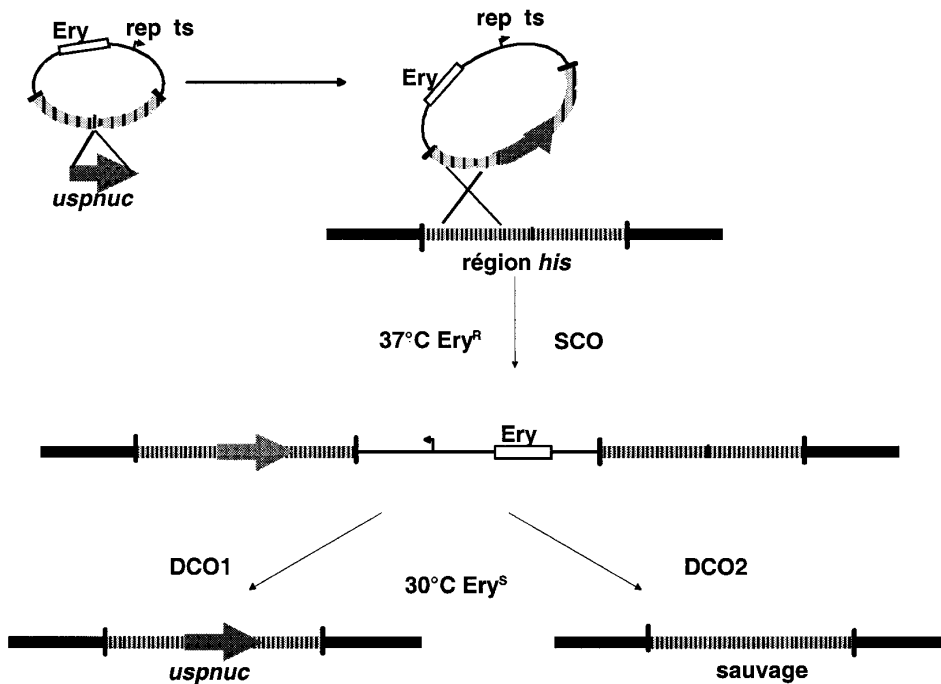


Figure 1. Construction de la souche parentale *L. lactis* MG1363[*usp nuc*]. La cassette *usp nuc* a été clonée dans un fragment de chromosome de *L. lactis* MG1363 correspondant à la région *his* (opéron de biosynthèse de l'histidine, inactif chez MG1363). Le vecteur utilisé est pGhost4, plasmide à répllication thermosensible (rep ts). La construction a été établie chez *L. lactis*, à 30 °C (température permissive pour la répllication du pGhost4). Par passage à 37 °C, un événement de recombinaison homologue par simple crossing-over a été sélectionné (SCO, phénotype Nuc⁺ et Erythromycine résistant). Le mutant obtenu est stable à 37 °C. Une culture à 30 °C de ce mutant SCO entraîne l'activation de la répllication du pGhost4 ce qui déstabilise la région d'intégration en générant de l'ADN simple brin, hautement recombinoène. Un deuxième événement de recombinaison homologue peut alors intervenir. La structure finale résultant d'un double crossing-over (DCO) aboutit à un retour au phénotype sauvage (DCO2) ou à l'obtention du mutant désiré MG1363[*usp nuc*] (DCO1, phénotype Ery sensible et Nuc⁺).

Figure 1. Construction of the parental strain *L. lactis* MG1363[*usp nuc*]. The *usp nuc* cassette was cloned into a MG1363 *his* chromosomal fragment (non expressed in MG1363) on pGhost4, a thermosensitive vector. The plasmid was introduced in *L. lactis*. The strain was grown at 30 °C, permissive temperature for pGhost4 replication. A single crossing-over event was selected after growth at 37 °C. The SCO mutant is then grown at 30 °C where pGhost4 replicates and generates a structure stimulating homologous recombination through a fragment upstream (DCO2) or downstream (DCO1) the *usp nuc* cassette. The actual mutant resulting from a double crossing-over event is identified by Nuc⁺ and Ery^S phenotypes.

capacité des cellules à sécréter Nuc mais aussi d'autres paramètres tels que la taille de la colonie, sa « vitalité » après mutagenèse et/ou la densité des colonies sur la boîte. Les Western effectués sur des cultures en phase stationnaire des 17 mutants ont permis de déterminer que seulement 6 d'entre eux sont réellement affectés dans la sécrétion de Nuc (Fig. 2). Les phénotypes observés *in vivo* chez les 11 autres semblent donc être dus aux limites du crible pouvant entraîner la sélection de mutants faux positifs.

L'analyse par Western des surnageants de culture a montré que M1, M13 et M14 sont hyposécréteurs et que M4 et M9 sont hypersécréteurs. Les quantités de Nuc sécrétées,

révélées par Western, chez M2 ne sont pas significativement différentes de celles sécrétées par la souche parentale, alors qu'il avait été identifié sur boîte comme mutant hypersécréteur. Par contre, M2 présente un profil atypique de sécrétion caractérisé par la disparition de la bande supérieure du doublet de NucB ce qui peut suggérer l'absence de clivage alternatif du PS. L'immunorévélation de NucB sous forme d'un singulet (bande inférieure atténuée) observé ici pour M1 n'a pas été confirmée. Le mutant M1 sécrète NucB sous forme d'un doublet, comme la souche parentale.

Dans les fractions cellulaires, il y a accumulation de précurseur pour M2 et M9 et, dans une moindre mesure pour M4 et M14.

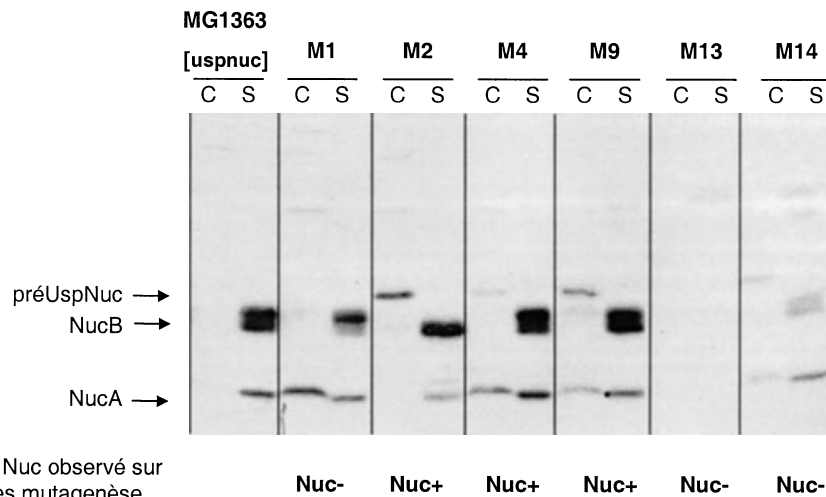


Figure 2. Confirmation des phénotypes Nuc des 6 mutants identifiés. Les extraits des protéines présentes dans les fractions cellulaires (C) et dans le milieu de culture (S) en phase stationnaire sont traités par SDS-PAGE et immunorévélés avec des anticorps anti-Nuc. La souche témoin utilisée est la souche parentale MG1363[usp_{nuc}] contenant le gène hybride *usp_{nuc}* sur le chromosome. Trois formes de Nuc sont détectées, le précurseur (préUspNuc), et les 2 formes sécrétées : NucB sous forme d'un doublet et NucA. Les phénotypes Nuc observés sur boîte sont rappelés sous l'immunorévélation.

Figure 2. Confirmation of Nuc phenotypes for the 6 identified mutants. Protein samples from cellular (C) and supernatant (S) fractions of stationary phase cultures were analyzed by immunorevelation on Western blot after SDS-PAGE. Secretion of Nuc in the 6 mutants was compared to the parental strain MG1363[usp_{nuc}]. Three Nuc forms were detected : the precursor form (préUspNuc) and 2 secreted form NucB (as a doublet) and NucA. Nuc phenotypes observed on Petri plates are given below the Western blot.

Ceci suggère une diminution de l'ES de Nuc dans ces mutants. Celle-ci n'est probablement pas liée à la saturation de la machinerie de sécrétion consécutive à la surproduction de préUspNuc chez M4 et M9. En effet, des niveaux de production nettement supérieurs ont déjà été obtenus à l'aide de constructions plasmidiques et aucune accumulation de préUspNuc n'a été observée (Le Loir et al., manuscrit en préparation). Dans le cas de M2 et M14, l'accumulation de précurseur pourrait résulter d'une mutation altérant la biosynthèse (ou la régulation) d'un facteur nécessaire à la sécrétion de préUspNuc. La forme NucA est détectée dans la fraction cellulaire des mutants M1, M4 et M9. Aucune corrélation ne semble exister entre cette présence et le phénotype Nuc.

À l'exception de M2, l'analyse des phénotypes par Western a donc confirmé les phénotypes observés avec le test *in vivo* réalisé sur les colonies bactériennes.

2.3. Obtention d'excisants des mutants

Les analyses des mutants s'effectuent à 37 °C et en présence d'érythromycine afin de maintenir le plasmide pGhost:ISSI intégré sur le chromosome. Ces conditions de culture constituent un stress pour les mutants et empêchent une comparaison directe et rigoureuse avec la souche parentale (cultivée à 30 °C et sans antibiotique). Le plasmide pGhost:ISSI a donc été excisé des 6 mutants afin de ne conserver que l'ISSI au site d'insertion. Obtenir ces excisants (notés E) revêt deux intérêts : (i) s'assurer que la mutation identifiée n'est ni dépendante de la température, ni de la résistance à l'antibiotique et (ii) analyser la mutation dans les mêmes conditions que la souche parentale. Le phénotype Nuc des excisants, analysé par Western (résultats non présentés), sont comparables à ceux des mutants correspondants : E1, E13 et E14 conservent un phénotype Nuc⁻, E4 et E9 un phénotype Nuc⁺. E2 garde le profil atypique de sécrétion de Nuc.

Nous pouvons ainsi conclure que les phénotypes Nuc observés sont indépendants de l'antibiotique et de la croissance à 37 °C. Les souches ainsi obtenues portent une mutation stable à 30 °C, température optimale de croissance de *L. lactis*.

2.4. Identification des gènes mutés

L'étape suivante a consisté à identifier le gène dans lequel pGhost:ISSI s'est intégré. L'outil de mutagenèse utilisé permet de cloner chez *E. coli* et de séquencer les fragments d'ADN chromosomique adjacents (côté *EcoRI* et côté *HindIII*) au site d'intégration de pGhost:ISSI [7].

Le clonage des jonctions *EcoRI* et *HindIII* a été mené sur les 6 mutants précédemment analysés. Cependant, pour des raisons techniques (insert de trop grande taille ou toxique pour *E. coli*), certaines jonctions n'ont pu être obtenues. Sur les jonctions clonées, la taille de l'insert a été estimée et la séquence nucléotidique déterminée. Les séquences ont été utilisées pour rechercher des homologies par comparaison avec la séquence du génome de *L. lactis*. Les résultats des homologies, la taille de l'insert, ainsi que les probabilités d'incertitude de ces homologies sont rassemblés dans le tableau I.

Les homologies obtenues permettent de classer les gènes touchés dans 2 catégories. La première comprend M9 et M14 touchés dans des gènes qui ne sont pas directement impliqués dans la sécrétion mais qui l'affectent indirectement à travers des perturbations du métabolisme global de la cellule. La seconde catégorie regroupe des gènes inconnus susceptibles d'intervenir dans la synthèse, la maturation ou la sécrétion d'une protéine hétérologue (M1, M2 et M4).

2.4.1. Cas de M9, M13 et M14

Seuls M9 et M14 ont été identifiés par séquençage de leurs deux jonctions. L'homologie obtenue avec la jonction *HindIII* de

Tableau I. Recherche d'homologie de séquence chez les gènes mutés. Les séquences des jonctions obtenues ont été comparées à la séquence complète du génome de *L. lactis* IL1403. P(N) correspond à la probabilité que l'homologie de séquence soit obtenue par erreur. On considère qu'une homologie obtenue avec un P(N) supérieure à 10^{-10} n'est pas significative.

Table I. Homology of the mutated genes. Sequences of the cloned junctions were compared to the complete genome sequence of *L. lactis* IL1403. P(N) is the probability that the homology is obtained by error. A homology with a P(N) above 10^{-10} is not significant.

Mutant	Jonction	Taille de l'insert (kb)	Gène de <i>L. lactis</i> touché	Homologie	P(N)
M1	<i>EcoRI</i>	1,2	<i>yahD</i>	<i>yxep</i> , <i>B. subtilis</i> , peptidase de la famille M40	10^{-16}
M2	<i>HindIII</i>	0,65	<i>yugD</i>	<i>yegQ</i> , <i>E. coli</i> , peptidase de la famille U32	10^{-75}
M4	<i>HindIII</i>	1,3	<i>yhfF</i>	<i>yorV</i> , <i>C. acetobutylicum</i> , protéine inconnue	10^{-41}
M9	<i>EcoRI</i>	0,9	<i>kup2</i>	<i>kup</i> , <i>E. coli</i> , protéine de transport du potassium	10^{-42}
	<i>HindIII</i>	1,3	<i>kup2</i>	<i>kup</i> , <i>E. coli</i> , protéine de transport du potassium	10^{-59}
M13	<i>HindIII</i>	0,9	/	Homologies non significatives	0.6
M14	<i>EcoRI</i>	1,3	<i>yreD</i>	<i>ptnA</i> , <i>E. coli</i> , système PTS	10^{-35}
	<i>HindIII</i>	1	<i>yreD</i>	<i>ptnA</i> , <i>E. coli</i> , système PTS	10^{-21}

M13 n'est pas significative et ne peut être prise en compte. Le clonage des jonctions manquantes est en cours et permettra de confirmer ou d'identifier (cas de M13) le gène touché.

Les deux jonctions de M9 présentent de l'homologie avec un gène codant pour une protéine impliquée dans le transport du potassium entre le milieu extérieur et la cellule. Cette mutation doit affecter le métabolisme cellulaire et entraîner, pour des raisons non élucidées, une surproduction de préUspNuc aboutissant au phénotype Nuc⁺ précédemment observé.

M14 est touché dans un gène impliqué dans le système PTS (Phosphoenolpyruvate:carbohydre phosphotransferase system). Ce système, par l'intermédiaire de plusieurs enzymes activées par des cascades de phosphorylation, est utilisé par la cellule pour choisir la source de carbone la plus appropriée lorsque plusieurs sont disponibles dans le milieu [11]. M14 présente une croissance très ralentie par rapport à la souche parentale. Ces résultats suggèrent que le phénotype Nuc⁻ résulte d'une

perturbation dans le métabolisme général de la cellule aboutissant à une sous-production (ou à la dégradation) de préUspNuc.

2.4.2. Cas de M1, M2 et M4

Les données de séquence concernant M1 établissent une homologie avec le gène *yxep* de *B. subtilis* qui code pour une protéine putative de 380 acides aminés (aa ; $41,6 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$), de fonction inconnue et classée dans la famille des peptidases M40 (classification Rawlings et Barrett, site expasy tools, <http://www.Expasy.ch/tools/>). Cette famille ne contient aucune protéine caractérisée.

Concernant M2, les recherches d'homologies ont montré que le gène potentiel touché, *yugD*, est homologue au gène *yegQ* d'*E. coli* (P(N) = 10^{-75}) qui spécifie une protéine putative de 453 aa ($51,2 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$) présentant un motif spécifique des peptidases de la famille U32 (Rawlings et Barrett, site expasy tools, <http://www.Expasy.ch/tools/>) qui contient une seule protéine caractérisée,

PrtC de *Porphyromonas gingivalis*, avec une activité collagénase nécessitant un cofacteur métallique. L'analyse de la séquence peptidique de la protéine putative YegQ révèle la présence de sites potentiels de phosphorylation et prédit une localisation cytoplasmique. La séquence peptidique, déduite de *yugD*, suggère elle aussi une localisation cytoplasmique. L'homologie avec une peptidase peut expliquer les phénotypes observés sur la sécrétion de Nuc chez le mutant M2 : disparition d'une des bandes du doublet NucB et faible quantité de NucA (la peptidase touchée pourrait intervenir dans le clivage du PS et le clivage du propeptide). Cependant, ces 2 clivages interviennent après translocation (à l'extérieur de la cellule). Ceci serait incompatible avec la prédiction de localisation cytoplasmique de YegQ sauf si l'on envisage une interaction entre YegQ et le translocon. Le clonage de la seconde jonction devrait nous apporter des informations complémentaires soit en confirmant que le gène touché est bien *yegQ*, soit en révélant une homologie avec un autre gène.

Les recherches d'homologies ont montré que le mutant M4 est touché dans le gène inconnu *yhfF*, qui est homologue au gène *yorV* de *Clostridium acetobutylicum* et *ybaD* de *E. coli*, deux gènes codant pour des protéines putatives de respectivement 129 aa ($15,2 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$) et 149 aa ($17,2 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$). Les fonctions de ces protéines sont inconnues. La seule indication concernant ces gènes est leur localisation dans une région en aval d'un facteur de transcription sigmaG [13]. De par leur position, ces gènes pourraient intervenir dans la régulation de la biosynthèse de sigmaG ce qui pourrait avoir une action sur le niveau d'expression du promoteur P_{usp45} .

3. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Une première mutagenèse a été menée sur une souche sécrétant efficacement la

nucléase Nuc. L'efficacité du test d'activité nucléolytique (halos rose plus ou moins intenses) a permis de cribler rapidement environ 15 000 colonies et d'identifier 17 mutants affectés dans la sécrétion de Nuc. Les phénotypes Nuc de 6 des 17 mutants isolés ont été confirmés. Ce résultat révèle une des limites du test puisque l'état physiologique des colonies après mutagenèse peut biaiser le crible et conduire à sélectionner des mutants faux positifs. Les données de séquence révèlent que 2 des 6 mutants sont affectés dans le métabolisme général et non dans des fonctions directement liées à la production ou à la sécrétion de protéines. Trois autres mutants semblent touchés dans des gènes dont les fonctions putatives permettent des corrélations plus directes avec les phénotypes d'altération de la sécrétion de Nuc observés. Aucune homologie significative n'a été trouvée pour le dernier, M13.

Il faut à présent caractériser de manière plus précise ces gènes, notamment en clonant les jonctions manquantes afin de préciser le contexte génétique de l'insertion et de confirmer les homologies obtenues.

Par ailleurs, nous avons débuté l'analyse d'autres phénotypes, en particulier pour le mutant M2 (*yugD*) qui semble affecté dans le clivage de protéines sécrétées telles que Nuc. À cet effet, nous avons choisi d'analyser l'activité autolytique sur des extraits protéiques issus de l'excisant E2. En effet, AcmA, l'autolysine majeure de *L. lactis*, est une protéine extracellulaire subissant plusieurs clivages après translocation chez une souche sauvage de lactocoque [2]. Nos résultats montrent que le mutant E2 produit le précurseur d'AcmA dans la fraction cellulaire et une forme mature dans le surnageant. Par contre, les formes issues des clivages secondaires sont absentes du surnageant. Ceci confirme que E2 est altéré dans sa capacité à effectuer des clivages protéolytiques secondaires. Le gène touché, *yugD*, ne présente pas d'homologie avec le gène *htrA*,

codant pour une protéase de ménage, extracellulaire, récemment décrite chez *L. lactis* IL1403 [10]. La protéine YugD pourrait cependant être nécessaire à la maturation d'HtrA, ou elle pourrait exercer une fonction similaire à celle d'HtrA chez *L. lactis* MG1363.

Nous comptons de même analyser la production et l'ancrage de PrtP, la protéase de surface de *L. lactis* [16], ainsi que la sécrétion d'une autre protéine hétérologue, AmyS, l' α -amylase de *Bacillus stearothermophilus* [9]. À cette fin, des plasmides contenant les gènes *prtP* ou *amyS* seront introduits dans les excisants correspondants aux différents mutants. L'analyse des clones PrtP⁺ ou AmyS⁺ obtenus apportera d'autres informations sur la capacité des mutants de sécréter d'autres protéines hétérologues que Nuc.

Une nouvelle campagne de mutagenèse est actuellement effectuée sur une souche de *L. lactis* MG1363[*uspNucT*] sécrétant moins efficacement Nuc et accumulant du précurseur préUspNucT. Son utilisation pour une nouvelle mutagenèse devrait orienter le crible vers l'identification de mutants hyper-sécréteurs.

Les résultats obtenus démontrent l'intérêt d'une approche aléatoire dans l'analyse d'un processus aussi complexe que la production et la sécrétion de protéines hétérologues chez *L. lactis*. La combinaison de la mutagenèse aléatoire et des données de la génomique devrait nous permettre à moyen terme d'identifier plusieurs des gènes intervenant dans ces processus.

REMERCIEMENTS

Nous remercions C. Delorme pour la séquence du fragment *his* de MG1363 utilisé dans ce travail, E. Maguin, pour le plasmide pGhost:ISS1, A. Sorokin pour les discussions concernant ce travail et S. Blugeon et C. Duplan pour leur précieuse assistance technique.

RÉFÉRENCES

- [1] Bolotine A., Mauger S., Malarme K., Ehrlich S.D., Sorokin A., Low-redundancy sequencing of the entire *Lactococcus lactis* IL1403 genome, in: Konings W.N., Kuipers O.P., Huis in 't Veld J.H.J. (Eds.), Proceedings of the sixth symposium on lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications, Antonie van Leeuwenhoek 76 (1999) 27–76.
- [2] 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 the cell separation, J. Bacteriol. 177 (1995) 1554–1563.
- [3] Delorme C., Godon J.J., Ehrlich S.D., Renault P., Mosaic structure of large regions of the *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* chromosome, Microbiology 140 (1994) 3053–3060.
- [4] Lachica R.V.F., Genigeorgis C., Hoeprich P.D., Metachromatic agar-diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity, Appl. Microbiol. 21 (1971) 585–587.
- [5] Le Loir Y., Gruss A., Ehrlich S.D., Langella P., Direct screening of recombinants in Gram-positive bacteria using the secreted staphylococcal nuclease as a reporter, J. Bacteriol. 176 (1994) 5135–5139.
- [6] 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.
- [7] Maguin E., Prévost H., Ehrlich S.D., Gruss A., Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other Gram positive bacteria, J. Bacteriol. 178 (1996) 931–935.
- [8] Nagarajan V., Protein secretion, in: Sonenshein A.L., Hoch J.A., Losick R. (Eds.), *Bacillus subtilis* and other Gram positive bacteria, American Society for Microbiology, Washington DC, USA, 1993, pp. 713–726.
- [9] Nakajima R., Imanaka T., Aiba S., Nucleotide sequence of the *Bacillus stearothermophilus* α -amylase gene, J. Bacteriol. 163 (1985) 401–406.
- [10] 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.
- [11] Postma P.W., Lengeler J.W., Jacobson G.R., Phosphoenolpyruvate-carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria, Microbiol. Rev. 57 (1993) 543–594.
- [12] Pugsley A.P., The complete general secretory pathway in Gram negative bacteria, Microbiol. Rev. 57 (1993) 50–108.

- [13] Sauer U., Treuner A., Buchholz M., Santangelo J.D., Durre P., Sporulation and primary sigma factors homologous genes in *Clostridium acetobutylicum*, *J. Bacteriol.* 176 (1994) 6572–6582.
- [14] Shortle D., A genetic system for analysis of staphylococcal nuclease, *Gene* 22 (1983) 181–189.
- [15] van Asseldonk M., Rutten G., Oteman M., Siezen R.J., de Vos W.M., Simons G., Cloning, expression in *Escherichia coli* and characterization of *usp45*, a gene encoding a highly secreted protein from *Lactococcus lactis* MG1363, *Gene* 95 (1990) 155–160.
- [16] Visser S., Exterkate F.A., Slangen C.J., de Veer G.J.C.M., Comparative study of the action of the cell wall proteinases from various strains of *Streptococcus cremoris* on bovine α_{S1} -, β -, κ -casein, *Appl. Environ. Microbiol.* 52 (1986) 1162–1166.