



**HAL**  
open science

## Sécrétion de protéines d'intérêt thérapeutique chez *Lactococcus lactis*

Yves Le Loir, Sébastien Nouaille, Luciana Ribeiro, Jacqueline Commissaire,  
Gérard Corthier, Sébastien Gilbert, Jean-Marc Chatel, René L'Haridon,  
Alexandra Gruss, Philippe Langella

► **To cite this version:**

Yves Le Loir, Sébastien Nouaille, Luciana Ribeiro, Jacqueline Commissaire, Gérard Corthier, et al..  
Sécrétion de protéines d'intérêt thérapeutique chez *Lactococcus lactis*. *Le Lait*, 2001, 81 (1-2), pp.217-  
226. 10.1051/lait:2001125 . hal-00895474

**HAL Id: hal-00895474**

**<https://hal.science/hal-00895474>**

Submitted on 11 May 2020

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

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

## Sécrétion de protéines d'intérêt thérapeutique chez *Lactococcus lactis*

Yves LE LOIR<sup>a</sup>, Sébastien NOUAILLE<sup>a</sup>, Luciana RIBEIRO<sup>a</sup>,  
Jacqueline COMMISSAIRE<sup>a</sup>, Gérard CORTIER<sup>b</sup>, Sébastien GILBERT<sup>b</sup>,  
Jean-Marc CHATEL<sup>c</sup>, René L'HARIDON<sup>d</sup>, Alexandra GRUSS<sup>a</sup>,  
Philippe LANGELLA<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Unité de Recherches Laitières et de Génétique Appliquée, INRA, Domaine de Vilvert,  
78352 Jouy-en-Josas Cedex, France

<sup>b</sup> Unité d'Ecologie et de Physiologie du Tube Digestif, INRA, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France

<sup>c</sup> Unité d'Immuno-Allergie Alimentaire INRA-CEA, 91190 Gif-sur-Yvette, France

<sup>d</sup> Unité de Virologie-Immunologie, INRA, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France

**Abstract** — **Secretion of heterologous proteins of therapeutical interest in *Lactococcus lactis*.**  
The GRAS (for Generally Regarded As Safe) bacterium, *Lactococcus lactis*, is a good candidate to produce heterologous proteins of vaccinal, medical or technological interest. The secretion of such proteins would allow a direct contact between the protein and its target and therefore would be a better mode of production than intracellular production. To develop heterologous protein export systems in *L. lactis*, we used the staphylococcal nuclease. We combined these secretion tools to the Nisin-Inducible Controlled Expression system. We first developed two new expression vectors allowing the inducible production of Nuc intra- and extracellularly. We then used them to produce in *L. lactis* two heterologous proteins of therapeutical interest: (i) the ovine omega interferon which possesses antiviral properties and which will be useful to enhance immune response in the case of the use of *L. lactis* as antigen delivery vehicle and (ii) a fusion protein between the Blg41–60 epitope and the mature part of Nuc.

***Lactococcus lactis* / staphylococcal nuclease / secretion / interferon /  $\beta$ -lactoglobulin**

**Résumé** — *Lactococcus lactis*, bactérie lactique modèle, est un micro-organisme GRAS (Generally Regarded As Safe). Sa parfaite innocuité et le développement des connaissances sur ses capacités de production et de sécrétion de protéines hétérologues en font un bon candidat pour la sécrétion de protéines d'intérêt thérapeutique. Notre équipe a développé de nombreux outils d'optimisation de la sécrétion de protéines hétérologues chez *L. lactis* que nous avons combinés au système d'expression inductible par la nisine. Les deux nouveaux vecteurs d'expression décrits permettent, en fonction des

---

\* Correspondance et tirés-à-part  
Tél. : (33) 1 34 65 20 83 ; fax : (33) 1 34 65 20 65 ; e-mail : langella@biotec.jouy.inra.fr

signaux choisis, une expression inductible et une localisation intra- ou extracellulaire de notre protéine modèle, la nucléase de *Staphylococcus aureus* (Nuc). Nous présentons ici deux exemples d'application de ces outils de sécrétion à des protéines d'intérêt thérapeutique. Les souches décrites permettent : (i) la production d'interféron omega ovin, molécule stimulant la réponse immunitaire, utile pour développer des vaccins vivants et (ii) la production d'une protéine de fusion épitope 41–60 de la  $\beta$ -lactoglobuline:Nuc, utile pour étudier les phénomènes allergiques liés à la  $\beta$ -lactoglobuline.

### ***Lactococcus lactis* / sécrétion / interféron / $\beta$ -lactoglobuline / nucléase**

## **1. INTRODUCTION**

Les bactéries lactiques (BL), largement utilisées dans des procédés industriels de fermentation agro-alimentaire, présentent une parfaite innocuité. Elles sont ingérées vivantes en grandes quantités et peuvent survivre dans le tractus digestif de l'hôte, homme ou animal, où elles sont susceptibles d'exercer diverses activités bénéfiques [12]. Depuis le début des années 1990, de nouvelles utilisations sont envisagées pour les BL telles que la production de protéines d'intérêt technologique ou thérapeutique [7, 13]. Pour cela, l'exportation des protéines, qui permet un contact direct avec la cible, semble une stratégie préférable à une production intracellulaire qui nécessite la lyse de la souche productrice. *Lactococcus lactis*, la BL modèle, sécrète seulement une protéine, Usp45, en quantités détectables [17] et cet aspect peut faciliter l'analyse de la sécrétion et la purification d'une protéine d'intérêt. Depuis une dizaine d'années, la capacité de *L. lactis* à produire et à exporter des protéines hétérologues a été explorée et a débouché sur la sécrétion de nombreuses protéines hétérologues [3, 10, 16].

Nous avons développé un système d'exportation de protéines hétérologues chez *L. lactis* à l'aide d'une protéine sécrétée modèle très stable et bien caractérisée, la nucléase de *Staphylococcus aureus* (Nuc) [8, 15]. Nuc est considérée comme un bon rapporteur car son activité est très facile-

ment détectable in vivo par un test de coloration sur des colonies bactériennes, en culture liquide ou extraites du tractus digestif [9].

Ce travail décrit le développement d'un système permettant la production inductible de protéines d'intérêt à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule. Le système nisine constitue un très bon outil de production de protéines hétérologues chez les BL grâce à son inductibilité et à sa forte potentialité de surexpression [2]. Ce système est constitué d'une souche de *L. lactis* (qui porte les gènes régulateurs *nisRK*) et du promoteur de l'opéron nisine ( $P_{nisA}$ ), un opéron de 11 gènes assurant la biosynthèse et la régulation de la nisine [2].  $P_{nisA}$  est inactif en absence de nisine et son activité est modulable en fonction de la concentration de nisine présente dans le milieu. A l'aide du système nisine, il est possible de multiplier par un facteur 1 000 le niveau d'expression d'un gène d'intérêt placé sous contrôle de  $P_{nisA}$  [2]. Ce système, parfaitement adapté à la production de protéines hétérologues, a été récemment utilisé avec succès chez *L. lactis* pour la production de la « Green Fluorescent Protein » [4].

Nous présentons, ici, trois résultats principaux obtenus dans le cadre de ces recherches chez *L. lactis* : (i) la construction de deux vecteurs d'expression, (ii) la production d'interféron omega ovin et (iii) la production d'une protéine de fusion épitope de la  $\beta$ -lactoglobuline:Nuc.

## 2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

### 2.1. Construction de nouveaux vecteurs d'expression chez *Lactococcus lactis*

Nous avons construit deux nouveaux vecteurs d'expression permettant la production inductible de Nuc à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule. Nous avons placé un fragment d'ADN spécifiant un précurseur pré-UspNuc (Le Loir et al., manuscrit en préparation) constitué du peptide signal d'Usp45 (SP<sub>Usp45</sub>), la protéine majoritairement sécrétée chez *L. lactis* [17], et de la partie mature de Nuc sous le contrôle de P<sub>nisA</sub>, le promoteur inductible de l'opéron de biosynthèse de la nisine [2]. La cassette d'expression obtenue P<sub>nisA</sub>usp<sub>nuc</sub> a été clonée sur un plasmide dérivé de pWV01. Le plasmide résultant, pSEC:UNuc (Tab. I et Fig. 1A), a ensuite été introduit chez *L. lactis* NZ9000, une souche portant sur son chromosome les gènes régulateurs *nisRK* [6]. À partir de pSEC:UNuc, nous avons éliminé le SP<sub>Usp45</sub> par une réaction de PCR inverse pour obtenir le plasmide pCYT:Nuc permettant la localisation intracellulaire de Nuc (Tab. I et Fig. 1A). Ce plasmide a aussi été introduit dans la souche de *L. lactis* NZ9000. Nous avons ensuite procédé à des cultures des deux souches NZ9000(pSEC:UNuc) et NZ9000(pCYT:Nuc) jusqu'à une DO<sub>600</sub> de 0,5. Une moitié des cultures a alors été induite par addition de 1 ng de nisine·mL<sup>-1</sup> alors que l'autre moitié ne l'a pas été. Nous avons ensuite procédé à des extractions de protéines dans les deux compartiments intracellulaire (C) et extracellulaire (S) des cultures induites et non-induites. Ces extraits ont été analysés par immuno-détection avec des anticorps polyclonaux dirigés contre Nuc après électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante (SDS-PAGE) (Fig. 1). Dans le cas de NZ9000(pCYT:Nuc) et de NZ9000(pSEC:UNuc), aucune protéine n'est détectée dans les extraits de la culture non-induite ce qui démontre que le système inductible est bien

régulé et fermé en phase exponentielle (Figs. 1A et 1B, lignes 1, 2, 5 et 6). Comme attendu avec NZ9000(pCYT:Nuc), nous n'observons pas de protéine dans le surnageant de la culture induite (Fig. 1, ligne 4) alors que nous observons dans la fraction C une bande majoritaire et une bande minoritaire correspondant respectivement à NucB et à NucA (Fig. 1, ligne 3). Dans le cas de NZ9000 (pSEC:UNuc), en présence de nisine, nous observons dans la fraction C, 3 bandes correspondant au précurseur pré-UspNuc et aux 2 formes matures NucB et NucA (Fig. 1, ligne 7). Comme attendu, les 2 bandes qui correspondent à NucB et NucA sont détectées dans la fraction S (Fig. 1, ligne 8). Nous pouvons estimer que les formes matures représentent environ 80 % des formes détectées dans le cas de NZ9000 (pSEC:UNuc). Ces résultats démontrent l'efficacité de la combinaison du système nisine et des outils développés autour de Nuc et nous pouvons désormais les appliquer à la production de protéines d'intérêt thérapeutique chez *L. lactis*.

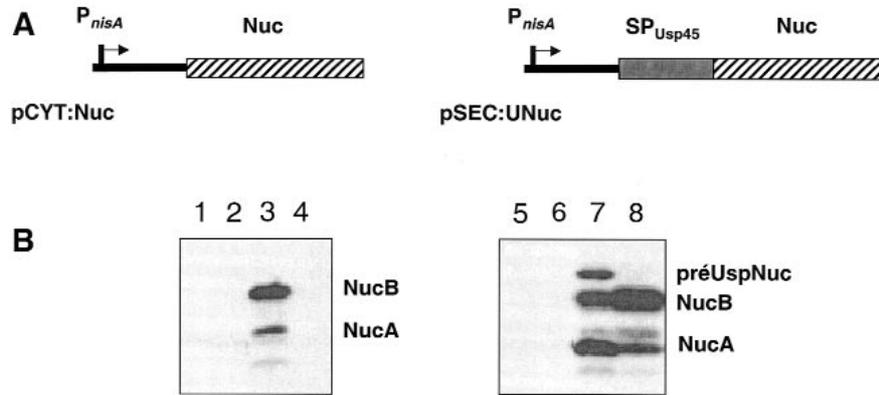
### 2.2. Production inductible d'interféron omega ovin chez *L. lactis*

La première application des vecteurs pSEC et pCYT a été faite avec l'interféron omega ovin (IFN- $\omega$ ). L'IFN- $\omega$  appartient à la famille des interleukines et ses propriétés antivirales en font une molécule intéressante à faire produire par *L. lactis*. L'IFN- $\omega$  ovin est capable de conférer une protection antivirale aux cellules par la diminution de la pénétration virale et par inhibition de la multiplication intracellulaire des virus entériques [11]. Une production par *L. lactis* d'IFN- $\omega$  ovin dans le tractus digestif pourrait induire une résistance aux virus entériques et protéger les entérocytes. La coexpression d'interleukines et d'antigènes chez *L. lactis* a déjà été expérimentée avec succès par Steidler et al. [16].

À partir du plasmide pSEC:UNuc, nous avons remplacé le fragment spécifiant *nuc*

**Tableau I.** Souches bactériennes et plasmides utilisés dans ce travail.**Table I.** Bacterial strains and plasmids used in this work.

Souche ou plasmide	Caractéristiques	Référence ou origine
Souches		
<i>Escherichia coli</i> TG1	[ <i>supE hsdΔ5 thi Δ(lacproAB) F'(traD36proAB+lacI<sup>q</sup> lacZΔM15)</i> ]	[5]
<i>Lactococcus lactis</i> MG1363	Souche dépourvue de plasmides	[8]
NZ9000	Souche dérivée de MG1363 ; <i>pepN:nisRnisK</i>	[6]
Plasmides		
pBluescript SK+II(pBS)	Amp <sup>r</sup>	Stratagene
pBS:Δnuc	Amp <sup>r</sup> ; contient le gène <i>nuc</i> sans son promoteur P <sub>staf</sub>	[9]
pCYT:Nuc	Cm <sup>r</sup> ; contient un fragment d'ADN spécifiant la partie mature de Nuc exprimée sous le contrôle transcriptionnel du promoteur inductible P <sub>nisA</sub>	Ce travail
pSEC:UNuc	Cm <sup>r</sup> ; contient le gène <i>uspNuc</i> spécifiant une fusion traductionnelle entre le peptide signal d'Usp45 et la partie mature de Nuc exprimée sous le contrôle transcriptionnel du promoteur inductible P <sub>nisA</sub>	Ce travail
pSEC: Nuc	Cm <sup>r</sup> ; contient le gène <i>nuc</i> spécifiant le précurseur de Nuc exprimé sous le contrôle transcriptionnel du promoteur inductible P <sub>nisA</sub>	Ce travail
pCYT:IFN	Cm <sup>r</sup> ; contient un fragment d'ADN spécifiant la partie mature de l'IFN omega ovin exprimée sous le contrôle transcriptionnel du promoteur inductible P <sub>nisA</sub>	Ce travail
pSEC:IFN	Cm <sup>r</sup> ; contient un fragment d'ADN spécifiant une fusion traductionnelle entre le peptide signal d'Usp45 et la partie mature de l'IFN omega ovin exprimée sous le contrôle transcriptionnel du promoteur inductible P <sub>nisA</sub>	Ce travail
pSEC:Blg41–60:Nuc	Cm <sup>r</sup> , pSEC:Nuc dans lequel un fragment d'ADN spécifiant l'épitope 41–60 de la BLG a été inséré entre le peptide signal de Nuc et la partie mature de Nuc.	Ce travail

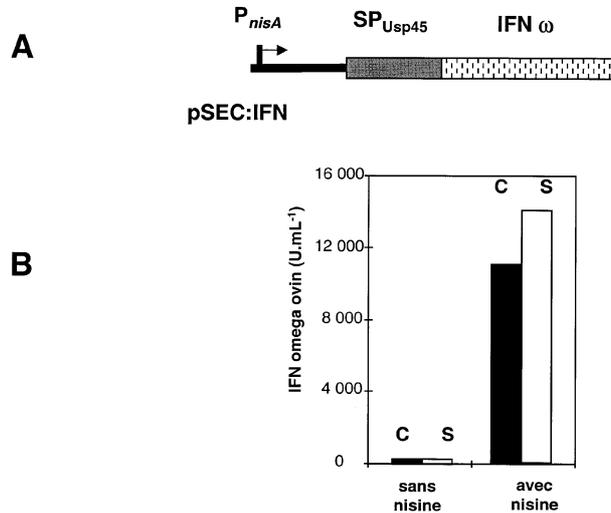


**Figure 1.** Analyse de la production de Nuc chez *Lactococcus lactis* sous la dépendance du promoteur inducible à la nisine. (A) Représentation schématique des cassettes d'expression de Nuc sous la dépendance du promoteur inducible à la nisine  $P_{nisA}$ . (B) Analyse par immunorévélation des souches de *L. lactis* NZ9000(pCYT:Nuc) et NZ9000(pSEC:UNuc) à l'aide d'anticorps anti-Nuc. Des extraits protéiques de ces souches ont été préparés en séparant les fractions cellulaires (C) et surnageants (S). À  $DO_{600} = 0,5$ , les cultures sont induites ou non avec  $1 \text{ ng de nisine} \cdot \text{mL}^{-1}$  et les extraits protéiques sont préparés 1 heure après l'induction. Les pistes 1 et 2 correspondent aux extraits C et S de la culture non-induite de NZ9000(pCYT:Nuc) ; les pistes 5 et 6 correspondent aux extraits C et S de la culture non-induite de NZ9000(pSEC:UNuc). Les pistes 3 et 4 correspondent aux extraits C et S de la culture induite de NZ9000(pCYT:Nuc) ; les pistes 7 et 8 correspondent aux extraits C et S de la culture induite de NZ9000(pSEC:UNuc). PréUspNuc : précurseur formé du  $SP_{Usp45}$  et de la partie mature NucB ; NucB et NucA : formes matures de Nuc.

**Figure 1.** Analysis of Nuc production under the control of the NICE system in *Lactococcus lactis*. (A) Schematic representation of the expression cassettes for Nuc production under the nisin-inducible promoter. (B) Western blot analysis of *L. lactis* strains NZ9000(pCYT:Nuc) and NZ9000(pSEC:UNuc) by the use of anti-Nuc antibodies. Protein extracts are separated in cellular (C) and supernatant (S) fractions. At  $OD_{600} = 0.5$ , cultures are divided in “- nisin” and “+ nisin” cultures where  $1 \text{ ng of nisin} \cdot \text{mL}^{-1}$  of culture are added. Protein extracts are prepared 1 hour after nisin induction. Lanes 1, 2 correspond to C and S extracts of the non-induced culture of NZ9000(pCYT:Nuc); lanes 5 and 6 correspond to C and S extracts of the non-induced culture of NZ9000(pSEC:UNuc). Lanes 3 and 4 correspond to C and S extracts of the induced culture of NZ9000(pCYT:Nuc); lanes 7 and 8 correspond to C and S extracts of the induced culture of NZ9000(pSEC:UNuc). PreUspNuc: precursor which is an hybrid fusion between  $SP_{Usp45}$  and the mature part NucB; NucB and NucA: mature forms of Nuc.

par l'ADN complémentaire (ADNc) spéci-  
fiant la partie mature de l'IFN- $\omega$ . Le plas-  
mide résultant, pSEC:IFN (Tab. I et Fig. 2),  
a été introduit dans la souche NZ9000  
et des cultures de la souche NZ9000  
(pSEC:IFN) ont été effectuées avec et sans  
induction par la nisine. Ces cultures ont  
ensuite été fractionnées entre compartiment  
intra- et extracellulaire et des mesures d'acti-  
vité ont été effectuées (Fig. 2). Ces mesures  
d'activité spécifique de l'IFN- $\omega$  sont basées  
sur la réduction de l'effet cytotoxique du

virus VS sur des cellules murines L929 et  
des cellules bovines MDBK (L'Haridon R.,  
communication personnelle). Dans le cas  
de la souche NZ9000(pSEC:IFN), de  
l'IFN- $\omega$  actif a été détecté dans les fractions  
intra- et extracellulaire à raison de respecti-  
vement  $1 \times 10^4$  et  $1,4 \times 10^4 \text{ U d'IFN-}\omega \cdot \text{L}^{-1}$   
(Fig. 2) ce qui correspond à une efficacité de  
sécrétion d'environ 56 %. Ces quantités  
sécrétées de  $140 \mu\text{g d'IFN-}\omega \cdot \text{L}^{-1}$  demeurent  
inférieures à celles obtenues par Steidler  
et al. [16] avec des souches de *L. lactis*



**Figure 2.** Production et quantification d'IFN- $\omega$  ovin chez *Lactococcus lactis*. (A) Représentation schématique de la cassette d'expression pour la sécrétion de l'IFN- $\omega$  ovin. Un fragment d'ADN complémentaire spécifiant l'IFN- $\omega$  ovin a été fusionné en aval du  $SP_{Usp45}$ . Le gène hybride  $SP_{Usp45}:IFN\omega$  est ainsi placé sous le contrôle de  $P_{nisA}$ . (B) Des mesures d'activité d'IFN- $\omega$  ovin ont été effectuées sur les fractions cellulaires (C) et surnageants (S) de cultures induites ou non avec 1 ng de nisine·mL<sup>-1</sup> de la souche de *L. lactis* NZ9000(pSEC:IFN).

**Figure 2.** Ovine IFN- $\omega$  production and quantification in *Lactococcus lactis*. (A) Schematic representation of the expression cassette for secretion of ovine IFN $\omega$ . A cDNA fragment encoding ovine IFN- $\omega$  was fused in frame with *usp45* secretion signal.  $SP_{Usp45}:IFN\omega$  cassette was cloned under the control of  $P_{nisA}$  and used for IFN- $\omega$  production in *L. lactis*. (B) IFN- $\omega$  activity assays performed on induced and non-induced cellular (C) and supernatant (S) fractions of cultures of *L. lactis* NZ9000(pSEC:IFN).

sécrétant 900  $\mu$ g d'interleukine 2 murine·L<sup>-1</sup>. On estime environ à 1 mg d'IFN- $\omega$ ·L<sup>-1</sup> la quantité moyenne requise pour obtenir une bonne efficacité antivirale. Par augmentation de la biomasse et grâce à l'utilisation d'un propeptide synthétique [10] et d'une souche de *L. lactis* dans laquelle la dégradation des protéines hétérologues est abolie [14], nous allons tenter d'augmenter les quantités obtenues afin d'atteindre ce seuil. Si nous parvenons à atteindre ce seuil, la souche NZ9000 (pSEC:IFN- $\omega$ ) pourrait se révéler très utile dans le cadre de l'utilisation de lactocoques en tant que vaccins vivants. Des essais de production intracellulaire de l'IFN- $\omega$  dans pCYT sont actuellement en cours afin de déterminer la localisation optimale.

### 2.3. Production d'une protéine de fusion épitope de la $\beta$ -lactoglobuline:Nuc chez *L. lactis*

Cette seconde application concerne la  $\beta$ -lactoglobuline (Blg) qui est l'allergène majeur du lait de vache [1]. Absente du lait humain, la Blg est un homodimère de 2 sous-unités de 18 kg·mol<sup>-1</sup> (162 aa et 2 ponts disulfures intramoléculaires). Ses propriétés intrinsèques lui confèrent une grande résistance aux protéases et à l'acidité du tube digestif. Peu dégradée lors du transit intestinal, elle peut passer dans le sang et déclencher une réaction immunitaire de type allergique caractérisée par la production d'immunoglobulines de type E [1].

Le pouvoir allergène de la Blg est principalement porté par 4 épitopes linéaires : Blg41-60, Blg97-108, Blg124-134 et Blg146-162 [18], dont le plus allergène semble être l'épitope Blg41-60 (Wal J.M., communication personnelle).

Des souches de *L. lactis* capables de sécréter un épitope immunogène de la Blg en fusion avec Nuc ont été construites en utilisant nos vecteurs d'expression inducible. L'administration de souches de *L. lactis* sécrétant différents types de protéines hybrides permettra de mieux préciser les domaines les plus allergènes de la Blg.

Nous avons appliqué une stratégie de fusion traductionnelle d'un épitope entre le SP<sub>Nuc</sub> et la partie mature de Nuc, déjà utilisée avec succès au laboratoire dans le cas d'un épitope du coronavirus bovin [7]. L'épitope Blg41-60 comprend les 20 aa situés du 41<sup>e</sup> au 60<sup>e</sup> résidu de la Blg (Fig. 3A). Nous avons construit des souches de *L. lactis* sécrétant la protéine hybride constituée de l'épitope Blg41-60 et de Nuc (Blg41-60:Nuc).

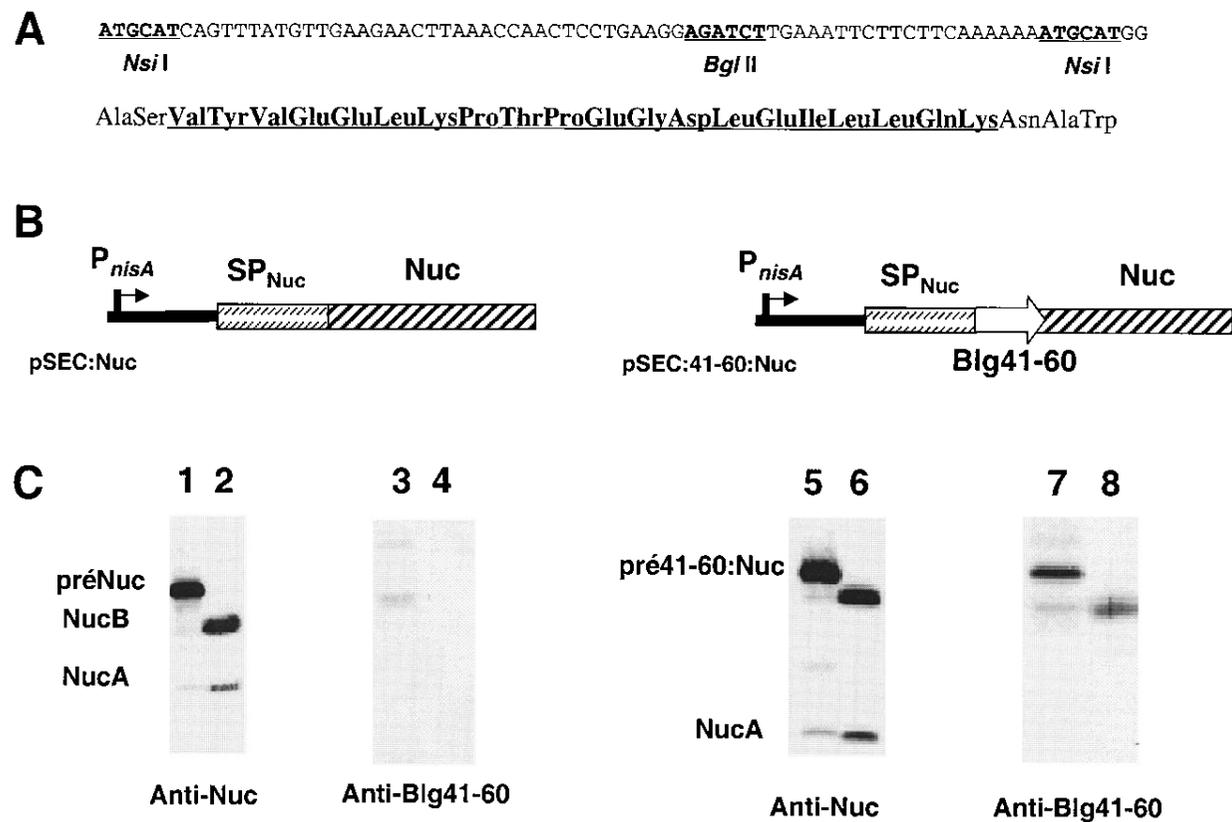
Nous avons choisi une fusion en N-terminal de la partie mature de Nuc pour les raisons suivantes : (i) présence d'un site *Nsi*I et (ii) faible efficacité du clivage secondaire NucB/NucA chez *L. lactis*. L'oligonucléotide spécifiant Blg41-60 peut être fusionné à Nuc selon deux orientations. L'orientation recherchée aboutit à une fusion traductionnelle entre Blg41-60 et Nuc et les clones produisant cette protéine hybride présentent un phénotype Nuc+ (halo rose). L'orientation inverse aboutit à l'apparition d'un codon « stop » qui conduit à la synthèse d'une protéine tronquée et les clones présentent alors un phénotype Nuc- (absence de halo). Après fusion, la présence de l'oligonucléotide peut être confirmée par la présence d'un site *Bgl*III. Enfin, le séquençage permet de déterminer le nombre d'oligonucléotides fusionnés.

Nous avons effectué les étapes de clonage de l'oligonucléotide chez *E. coli* TG1 [5] dans un vecteur dérivé de pBS

(pBS:Δnuc) contenant le gène *nuc* sans promoteur. Malgré l'absence de promoteur, on observe dans ce contexte une faible expression de *nuc* qui permet la sélection de clones Nuc+ et Nuc-. Nous avons retenu un clone Nuc+ possédant un épitope Blg41-60 inséré en phase traductionnelle avec *nuc*. Ce gène de fusion *41-60:nuc* a ensuite été exprimé chez *L. lactis* sous contrôle de P<sub>*nisA*</sub> afin de produire la protéine hybride Blg<sub>*nisA*</sub>41-60:Nuc. Pour cela, nous avons utilisé le plasmide pSEC:Nuc (dérivé de pSEC:UNuc où SP<sub>Usp45</sub> est remplacé par SP<sub>Nuc</sub>) dans lequel le fragment *nuc* a été remplacé par *41-60:nuc* (Tab. I et Fig. 3B).

Le plasmide résultant, pSEC:Blg41-60:Nuc, a été introduit dans la souche de *L. lactis* NZ9000. Des extraits protéiques des souches NZ9000(pSEC:Nuc) et NZ9000(pSEC:Blg41-60:Nuc) ont été préparés à partir de cultures induites ou non par la nisine, et après SDS-PAGE, immunorévélés par les anticorps anti-Nuc et anti-Blg41-60 (Fig. 3C). Chez NZ9000(pSEC:Nuc), le précurseur préNuc est présent dans la fraction cellulaire, NucB et NucA sont sécrétées dans le milieu. Aucun signal n'est détecté avec les anti-Blg41-60. Ce même profil est rencontré chez la souche NZ9000(pSEC:Blg41-60:Nuc). NucA a le même poids moléculaire que chez NZ9000(pSEC:Nuc). Par contre, les bandes correspondant au précurseur et à la protéine mature sécrétée ont un poids moléculaire supérieur en raison des 23 aa fusionnés en N-terminal de NucB. De façon similaire, les anticorps anti-Blg41-60 réagissent avec le précurseur préBlg41-60-Nuc et la forme mature Blg41-60-Nuc.

Ces résultats confirment la reconnaissance de la protéine hybride par les deux anticorps et que la protéine demeure non toxique même à un niveau élevé de production, estimé aux alentours de 20 mg·L<sup>-1</sup> (par comparaison avec une gamme de Nuc commerciale). Dans ces conditions, nous démontrons que la protéine hybride est bien reconnue par les anti-Nuc, et moins bien par les anti-Blg41-60. Ceci peut être dû à une plus faible immunoréactivité de ces anticorps.



**Figure 3.** Expression inducible de la protéine hybride Blg41–60:Nuc chez *Lactococcus lactis*. (A) Caractéristiques de l'épitope Blg41–60. La séquence nucléotidique spécifiant l'épitope Blg41–60 a été obtenue par appariement de 2 oligonucléotides de synthèse et remplissage des extrémités. A chacune de ses extrémités, un site de restriction *Nsi*I a été ajouté afin de le fusionner entre les séquences spécifiant SP<sub>Nuc</sub> et la partie mature de Nuc. Le site *Bgl*II

présent dans Blg41–60 et absent des vecteurs employés permet de vérifier son intégration par linéarisation du vecteur. La séquence peptidique spécifiée après intégration de l'oligonucléotide en fusion traductionnelle avec *nuc* est représentée : en gras souligné la séquence de l'épitope, les autres aa proviennent de l'ajout des sites de clonage. **(B)** Représentation schématique des cassettes d'expression permettant la sécrétion inductible de Nuc et de Blg41–60 :Nuc. **(C)** Analyse par immunorévélation des souches de *L. lactis* NZ9000(pSEC:Nuc) et NZ9000(pSEC:41–60:Nuc) à l'aide d'anticorps anti-Nuc et anti-Blg41–60. Des extraits protéiques de ces deux souches ont été préparés en séparant les fractions cellulaires (C) et surnageants (S). À  $DO_{600} = 0,5$ , les cultures sont induites avec 1 ng de nisine·mL<sup>-1</sup> et les extraits protéiques sont préparés une heure après l'induction. Les pistes 1 et 2 correspondent aux extraits C et S de la culture induite de NZ9000(pSEC:Nuc) immunorévélés avec des anticorps anti-Nuc et les pistes 3 et 4 correspondent aux mêmes extraits immunorévélés avec des anticorps anti-Blg41–60. Les pistes 5 et 6 correspondent aux extraits C et S de la culture induite de NZ9000(pSEC:41–60:Nuc) immunorévélés avec des anticorps anti-Nuc et les pistes 7 et 8 correspondent aux mêmes extraits immunorévélés avec des anticorps anti-Blg41–60. PréNuc : précurseur de Nuc ; NucB et NucA : formes matures de Nuc et pré41–60Nuc : précurseur de la protéine de fusion Blg41–60:Nuc.

**Figure 3.** Inducible expression of the hybrid protein Blg41–60:Nuc in *Lactococcus lactis*. **(A)** The nucleotidic sequence encoding the epitope Blg41–60 was obtained after the annealing of two synthetic oligonucleotides and filling of the ends. At both ends, a *NsiI* restriction site was added to fuse in-frame this DNA fragment between SP<sub>Nuc</sub> and the mature part NucB. The *BglIII* restriction site present in the epitope Blg41–60 and absent of our expression vectors allowed the screening and the control of the fusion of the epitope. The peptidic sequence of the fused 41–60 epitope: the 20 amino acids of the epitope are written in bold underlined; the others are the translation products of the added DNA restriction sites. **(B)** Schematic representation of the expression cassettes for the secretion of Nuc and the hybrid protein Blg41–60:Nuc. **(C)** Western blots analysis of *L. lactis* strains NZ9000(pSEC:Nuc) and NZ9000(pSEC:41–60:Nuc) by the use of anti-Nuc and anti-Blg41–60 antibodies. Protein extracts are separated in cellular (C) and supernatant (S) fractions. At  $OD_{600} = 0,5$ , cultures are induced with 1 ng of nisine·mL<sup>-1</sup> of culture. Protein extracts are prepared 1 hour after nisin induction. Lanes 1 and 2 correspond to C and S extracts of the induced culture of NZ9000(pSEC:Nuc) hybridized with anti-Nuc antibodies and lanes 3 and 4 correspond to the same extracts hybridized with anti-Blg41–60 antibodies. Lanes 1 and 2 correspond to C and S extracts of the induced culture of NZ9000(pSEC:Nuc) hybridized with anti-Nuc antibodies and lanes 3 and 4 correspond to the same extracts hybridized with anti-Blg41–60 antibodies. Lanes 5 and 6 correspond to C and S extracts of the induced culture of NZ9000(pSEC:41–60:Nuc) hybridized with anti-Nuc antibodies and lanes 7 and 8 correspond to the same extracts hybridized with anti-Blg41–60 antibodies. PreNuc: precursor of Nuc; NucB and NucA: mature forms of Nuc and pre41–60Nuc: precursor of the fusion protein Blg41–60:Nuc.

### 3. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les deux vecteurs d'expression décrits constituent un système efficace de production de protéines d'intérêt chez *L. lactis*. Les souches productrices d'IFN- $\omega$  seront utilisées dans des stratégies de vaccination orale avec des lactocoques recombinants. Par ailleurs, nous avons démontré que la protéine de fusion Blg41-60:Nuc était efficacement sécrétée et reconnue par des anticorps anti-Nuc et anti-Blg41-60. Des essais sont en cours avec la Blg entière et ces souches seront administrées à des souris allergiques (ou non) à la Blg afin de mesurer les réponses immunitaires.

Ce système est en cours d'optimisation grâce à l'utilisation du propeptide synthétique [10] et de la souche *htrA* de *L. lactis* [14]. Dans notre laboratoire, il est en cours d'application à des antigènes de la bactérie pathogène *Brucella abortus* en vue de construire des souches vaccinales contre la brucellose (Ribeiro, L., communication personnelle). Gageons qu'à l'avenir, de telles souches pourront apporter des solutions originales à des problèmes de santé animale ou humaine.

### REMERCIEMENTS

Nous remercions I. Poquet, R. Lemerre, A. Aucouturier et J.M. Wal pour les nombreuses discussions concernant ces travaux. Nous tenons aussi à remercier vivement S. Blugeon et C. Duplan pour leur collaboration active à ces travaux.

### RÉFÉRENCES

- [1] Chatel J.M., Bernard H., Clement G., Frobert Y., Batt C.A., Gavalchin J., Peltres G., Wal J.M., Expression, purification and immunochemical characterization of recombinant bovine beta-lactoglobulin, a major cow milk allergen, *Mol. Immunol.* 33 (1996) 1113–1118.
- [2] de Ruyter P.G.G.A., Kuipers O.P., de Vos W.M., Controlled Gene Expression Systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin, *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996) 3662–3667.
- [3] Drouault S., Corthier G., Ehrlich S.D., Renault P., Expression of the *Staphylococcus hyicus* lipase in *Lactococcus lactis*, *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 588–598.
- [4] Geoffroy M.C., Guyard C., Quatannens B., Pavan S., Lange M., Mercenier A., Use of Green Fluorescent Protein To Tag Lactic Acid Bacterium Strains under Development as Live Vaccine Vectors, *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 383–391.
- [5] Gibson T.J., Ph.D. Thesis, University of Cambridge, England, 1984.
- [6] Kuipers O.P., Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria, *J. Biotechnol.* 64 (1998) 15–21.
- [7] Langella P., Le Loir Y., Heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*: a novel antigen delivery system, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32 (1999) 191–198.
- [8] Langella P., Le Loir Y., Piard J.C., Poquet I., Gruss A., Exportation de protéines hétérologues chez *Lactococcus lactis*: développement d'outils moléculaires pour l'étude et les applications, *Sci. Aliments* 20 (2000) 137–142.
- [9] 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.
- [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] L'Haridon R., Propriétés antivirales et antilutolytiques d'interférons immobilisés, Université de Pharmacie, Paris XI, 1994.
- [12] Marteau P., Rambaud J.C., Potential of using lactic acid bacteria for therapy and immunomodulation in man, *FEMS Microbiol. Rev.* 12 (1993) 207–220.
- [13] Mercenier A., Lactic acid bacteria as live vaccines in: Tannock G.W. (Ed.), *Probiotics: A Critical Review*, Harizon Scientific Press, Norfolk, UK, 1999, pp. 113–127.
- [14] 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.
- [15] Shortle D., A genetic system analysis of staphylococcal nuclease, *Gene* 22 (1983) 181–189.
- [16] Steidler L., Robinson K., Chamberlain L., Schofield M., Remaut E., Le Page R.W.F., Wells J.M., Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine, *Infect. Immun.* 66 (1998) 3183–3189.
- [17] van Asseldonk M., de Vos W.M., Simons G., Functional analysis of the *Lactococcus lactis usp45* secretion signal in the secretion of a homologous proteinase and a heterologous alpha-amylase, *Mol. Gen. Genet.* 240 (1993) 428–434.
- [18] Wal J.M., Immunochemical and molecular characterisation of milk allergens, *Allergy* 53 (1998) 114–117.