



HAL
open science

Les peptidases des lactocoques

V Monnet, Mp Chapot-Chartier, Jc Gripon

► **To cite this version:**

V Monnet, Mp Chapot-Chartier, Jc Gripon. Les peptidases des lactocoques. Le Lait, 1993, 73 (2), pp.97-108. hal-00929336

HAL Id: hal-00929336

<https://hal.science/hal-00929336>

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.

Les peptidases des lactocoques

V Monnet, MP Chapot-Chartier, JC Gripon

Unité d'enzymologie, station de recherches laitières, INRA, 78352 Jouy-en-Josas, France

Résumé — Les lactocoques sont exigeants sur le plan nutritionnel et sont auxotrophes pour certains acides aminés. Pour trouver l'azote aminé nécessaire à leur croissance optimale, ces bactéries doivent hydrolyser les protéines du lait. Une protéinase liée aux enveloppes cellulaires (maintenant bien caractérisée) libère des peptides de taille supérieure à 5 résidus. Ces derniers sont hydrolysés par des peptidases en acides aminés libres et en petits peptides capables d'être transportés à travers la membrane par des systèmes de transport actif. Outre leur rôle dans la nutrition azotée, les peptidases permettent, dans les fromages, l'hydrolyse des peptides amers et la libération d'acides aminés libres et de petits peptides, précurseurs de composés d'arômes. Le système peptidasique des lactocoques comprend au moins 3 aminopeptidases, une dipeptidase, une tripeptidase, une X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase, une prolidase, et 3 endopeptidases. Actuellement, les gènes codant pour 3 peptidases différentes ont été clonés et séquencés. Il s'agit des gènes *pepN* et *pepC* codant chacun pour une aminopeptidase de spécificité large, et du gène *pepX* codant pour la X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase. Les propriétés, la localisation cellulaire et le rôle de ces enzymes dans la nutrition azotée des lactocoques sont discutés dans cette revue.

protéolyse / peptidases / nutrition azotée / *Lactococcus lactis*

Summary — **Lactococcal peptidases.** *Lactococci are nutritionally fastidious and are auxotrophic for several amino acids. In order to find the nitrogen source necessary to grow to high cell density, these bacteria need to hydrolyze milk proteins. A cell envelope-associated proteinase (which is now well characterized) releases peptides composed of > 5 residues. These peptides are further hydrolyzed into free amino acids and small peptides which can be transported through the cytoplasmic membrane by active transport systems. In addition to their role in nitrogen supply, peptidases are responsible for the degradation of bitter peptides in cheese and for the release of free amino acids and small peptides which are precursors of aromatic compounds. The lactococcal peptidasic system is composed of at least 3 aminopeptidases, one dipeptidase, one tripeptidase, one X-prolyl-dipeptidyl-aminopeptidase, one prolidase and 3 endopeptidases. Up to now, the genes coding for 3 different peptidases have been cloned and sequenced: pepN and pepC, each of them encoding an aminopeptidase with broad specificity, and pepX encoding the X-prolyl-dipeptidyl-aminopeptidase. The properties, the cellular location and the role of these enzymes in bacterial nutrition are discussed in this review.*

proteolysis / peptidases / nitrogen nutrition / *Lactococcus lactis*

INTRODUCTION

Les premières études concernant la mise en évidence d'activités peptidasiques chez les bactéries lactiques ainsi que la caractérisation des enzymes impliquées sont déjà assez anciennes (Mou *et al*, 1975; Desmazeaud and Zevaco, 1977; Schmidt *et al*, 1977; Law, 1979; Cliffe et Law, 1979; Kaminogawa *et al*, 1984). Cependant, l'amélioration constante des techniques de séparation des protéines d'une part, et le développement des techniques de biologie moléculaire appliquées aux bactéries lactiques d'autre part, ont récemment donné un nouvel essor à l'étude des peptidases des bactéries lactiques. Les données accumulées sur la protéinase extracellulaire des lactocoques et les peptides qu'elle libère ont également été une incitation à la recherche de peptidases impliquées dans la suite du processus de protéolyse chez les lactocoques (tableau I).

Les lactocoques sont exigeants sur un plan nutritionnel et sont auxotrophes pour au moins 4 acides aminés (His, Ile, Leu, Val) (Chopin, communication personnelle). Ces bactéries doivent donc trouver dans le lait l'azote aminé qui leur est nécessaire et pour cela hydrolyser les protéines du lait. Il est maintenant bien établi qu'une protéinase liée aux enveloppes cellulaires est indispensable à la croissance optimale des lactocoques sur lait (Thomas et Mills, 1981). Elle a été bien caractérisée tant sur le plan biochimique que génétique (revue de Thomas et Pritchard, 1987 ; revue de Kok & Venema, 1988). Elle hydrolyse les caséines et libère des peptides qui sont généralement hydrophobes, riches en proline et trop longs pour pouvoir traverser la membrane plasmique (Monnet *et al*, 1986, 1989, 1992; Visser *et al*, 1988, 1991; Reid *et al*, 1991a et b). La nutrition azotée des lactocoques et par conséquent leur croissance optimale passe donc par une hy-

drolyse plus poussée de ces peptides par des peptidases. Outre leur rôle dans la nutrition azotée, les peptidases permettent, dans un contexte fromager, l'hydrolyse des peptides amers et la libération d'acides aminés libres et de petits peptides, précurseurs de composés d'arôme. Elles participent donc aussi à l'apparition recherchée des qualités organoleptiques des fromages. Pour ces 2 raisons, de nombreuses équipes cherchent à isoler, caractériser ces peptidases et à les modifier ou à amplifier leur activité en vue de construire des souches de lactocoques plus performantes.

AMINOPEPTIDASES

Caratérisation biochimique des enzymes

Les aminopeptidases sont les peptidases de lactocoques les plus étudiées, sans doute parce que leur détection a été, au départ, facilitée par l'emploi de substrats chromogènes (acides aminés p-nitroanilide ou β -naphthylamide). Trois aminopeptidases ont plus spécialement été isolées et caractérisées chez les lactocoques. Deux d'entre elles ont une spécificité large mais sont cependant clairement différentes. L'aminopeptidase N (PepN), isolée de la souche de *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* Wg2, est une métalloenzyme monomérique d'un poids moléculaire de 95 kDa (Tan et Konings, 1990). Elle semble similaire à celles isolées par Desmazeaud et Zevaco (1979) à partir d'une souche de *L. lactis* subsp *diacetylactis* et par Geis *et al* (1985) à partir d'une souche de *L. lactis* subsp *cremoris* AC1. L'aminopeptidase C (PepC) est une enzyme à cystéine, isolée de la souche *L. lactis* subsp *cremoris* AM2, ayant une structure hexamérique et un poids moléculaire de 300 kDa (Neviani *et*

al, 1989). L'aminopeptidase A, quant à elle, présente une spécificité étroite puisqu'elle ne libère que les résidus Asp et Glu en position N-terminale. C'est une métalloenzyme isolée de *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO 712 par Niven (1991) qui lui attribue un poids moléculaire de 245 kDa et une structure hexamérique et par Exterkate et de Veer (1987a) à partir de la souche *L. lactis* subsp. *cremoris* HP; ces derniers la décrivent comme un trimère de 130 kDa associé à la membrane. Les 2 enzymes décrites sont très thermostables et seules des études complémentaires comme l'établissement de la séquence de leur gène permettraient de savoir s'il s'agit de la même protéine.

Clonage et séquençage des gènes

Actuellement, les gènes codant pour 3 peptidases différentes ont été clonés et séquencés. Deux d'entre eux concernent des aminopeptidases. Il s'agit des gènes *pepN* et *pepC*, codant pour chacune des 2 aminopeptidases de spécificité large.

Le gène *pepN* a été cloné et séquencé dans 2 souches différentes de *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 (van Alen-Boerrigter *et al*, 1991; Tan *et al*, 1992) et Wg2 (Stroman, 1992). Dans les 2 cas, le gène a été isolé à partir d'une banque d'ADN de la souche de lactocoque chez *Escherichia coli*; dans le cas de MG1363, cette banque a été construite dans le phage λ EMBL3 et a été criblée à l'aide d'anticorps spécifiques de l'enzyme, alors que dans le cas de Wg2, une sonde d'oligonucléotides dérivée de la séquence N-terminale de l'enzyme a été utilisée pour le criblage de la banque. Le gène *pepN* correspond à une phase ouverte de lecture codant pour une protéine de 846 résidus dont la taille est en accord avec la masse moléculaire de 95 kDa déterminée pour

l'enzyme purifiée. La séquence en acides aminés de *PepN* déduite de la séquence nucléotidique présente des homologies importantes avec les métallo-aminopeptidases de mammifères (homme, rat, souris) avec plus de 25% d'identité. La région la plus conservée entre les différentes aminopeptidases est également homologue avec la famille des protéases neutres dépendantes du zinc telles que la thermolysine. Ce segment fait partie du site actif et contient le site de liaison du zinc. Aucune séquence signal n'a été identifiée à l'extrémité N-terminale.

Le gène *pepC* codant pour la deuxième aminopeptidase de spécificité générale présente chez les lactocoques a été également cloné et séquencé récemment (Chapot-Chartier *et al*, 1993). Ce clonage a été réalisé par complémentation d'un mutant *pepN* de *E. coli* déficient en activité aminopeptidase. Une banque d'ADN total de la souche de *L. lactis* subsp. *cremoris* AM2 a été construite dans un vecteur plasmidique chez le mutant de *E. coli* et cette banque a été criblée par un test enzymatique sur boîte de Pétri à l'aide du substrat Leu- β naphtylamide. Les anticorps dirigés contre l'enzyme *PepC* purifiée ont permis de montrer que l'un des clones sélectionnés exprimait *PepC*. Le fragment cloné contient une phase ouverte de lecture codant pour une protéine de 436 résidus dont la masse moléculaire correspond à celle d'une sous-unité de l'enzyme (50 kDa). Aucune séquence signal n'est présente, ce qui indique une localisation intracellulaire de l'enzyme en accord avec les expériences de fractionnement cellulaire et les expériences d'immunocytochimie (Tan *et al*, 1992). La séquence en acides aminés déduite de la séquence nucléotidique, présente une forte homologie avec le site actif des protéases à cystéine avec conservation des résidus impliqués dans la catalyse (fig 1). En dehors du site actif, aucune homologie n'est observée avec la

Tableau I. Peptidases isolées des lactocoques.

Peptidases	Souches	Spécificité	PM	Nb de sous-unités	Type	pH opt	T opt (°C)	Gène séquencé	Référence
<i>Aminopeptidases</i>									
Pep C	<i>L. lactis</i> subsp <i>cremoris</i> AM2	Large	300	6	Cystéine	7	40	Oui	Neviani <i>et al</i> (1989)
Pep N	<i>L. lactis</i> subsp <i>cremoris</i> Wg2	Large	95	1	Metallo	7	40	Oui	Tan et Konings (1990)
	<i>L. lactis</i> subsp <i>diacetylactis</i> CNRZ 267	Large	85	1	Metallo	6,5	35	Non	Desmazeaud et Zevaco (1979)
	<i>L. lactis</i> subsp <i>cremoris</i> AC1	Large	36	1	Metallo	7	40	Non	Geis <i>et al</i> (1985)
GAP I	<i>L. lactis</i> subsp <i>cremoris</i> HP	Asp et Glu spécifique	130	3	Metallo		50 55	Non	Exterkate et de Veer (1987a)
GAP II	<i>L. lactis</i> subsp <i>lactis</i> NCDO 712	Asp et Glu spécifique	245	6	Metallo	8	65	Non	Niven (1991)
<i>Di- et tripeptidases</i>									
DIP I	<i>L. lactis</i> subsp <i>diacetylactis</i> CNRZ 267	spécifique des Met-X	51	1	Metallo	7,5 8		Non	Desmazeaud et Zevaco (1977)
DIP II	<i>L. lactis</i> subsp <i>cremoris</i> H61	Large	100		Metallo	8		Non	Hwang <i>et al</i> (1981)
DIP III	<i>L. lactis</i> subsp <i>cremoris</i> Wg2	Large	49	1	Metallo	8	50	Non	Van Boven <i>et al</i> (1988)
TRP I	<i>L. lactis</i> subsp <i>diacetylactis</i> CNRZ 267	Large	75		Metallo	7	35	Non	Desmazeaud et Zevaco (1977)
TRP II	<i>L. lactis</i> subsp <i>cremoris</i> Wg2	Large	105	2	Metallo	7,5	55	Non	Bosman <i>et al</i> (1990)

Peptidases spécifiques des prolines

X-Prolyl dipeptidyl aminopeptidase

Pep X	<i>L. lactis</i> subsp <i>cremoris</i> P8-2-47	Spécifique de X-Pro en N terminal	180	2	Sérine	7	45 50	Oui	Kiefer-Partsch <i>et al</i> (1989)
XAP I	<i>L. lactis</i> subsp <i>cremoris</i> AM2	"	117		Sérine			Non	Booth <i>et al</i> (1990b)
Pep X	<i>L. lactis</i> subsp <i>lactis</i> NCDO 763	"	190	2	Sérine	8,5	40	Oui	Zevaco <i>et al</i> (1990)
XAP II	<i>L. lactis</i> subsp <i>lactis</i> H1	"	150	2	Sérine			Non	Lloyd et Pritchard (1991)
<i>Prolidase</i>									
PRD I	<i>L. lactis</i> subsp <i>cremoris</i> H61	Spécifique de X-Pro	43		Metallo	6,5 7,5	40	Non	Kaminogawa <i>et al</i> (1984)
PRD II	<i>L. lactis</i> subsp <i>cremoris</i> AM2	"	42		Metallo	7,3 9		Non	Booth <i>et al</i> (1990b)
<i>Proline iminopeptidase</i>									
PIP	<i>L. lactis</i> subsp <i>cremoris</i> HP	Spécifique de Pro-X et Pro-X-Y	110	2	Metallo	8,5	37	Non	Baankreis et Exterkate (1991)
<i>Endopeptidases</i>									
LEP I	<i>L. lactis</i> subsp <i>cremoris</i> H61	Large	98	1	Metallo	7 7,5	40	Non	Yan <i>et al</i> (1987a)
LEP II	"	Large	80	2	Metallo	6	37	Non	Yan <i>et al</i> (1987b)
LEP III	<i>L. lactis</i> subsp <i>cremoris</i> Wg2	Large	70	1	Metallo	6 6,5	30 38	Non	Tan <i>et al</i> (1991)

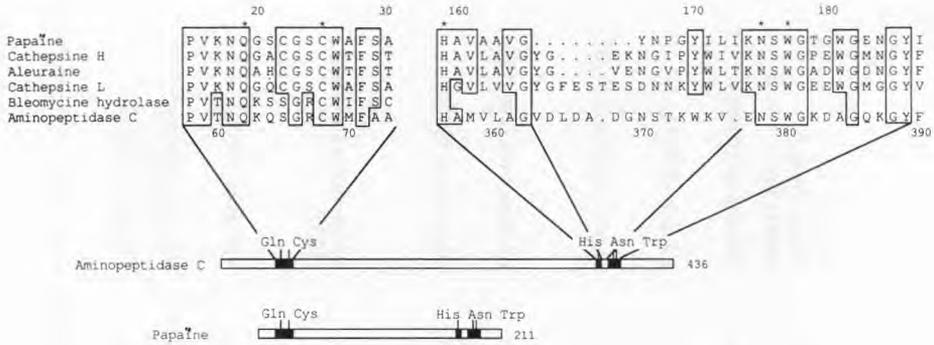


Fig 1. Conservation de la séquence en acides aminés entre l'aminopeptidase PepC de *L. lactis* subsp *cremoris* AM2 et les protéases à cystéine. En bas : régions conservées entre PepC et la papaïne. Les numéros à droite correspondent à la longueur de chaque polypeptide. Les parties en noir représentent les régions conservées dans les 2 séquences, et qui contiennent les résidus du site actif de la papaïne. En haut : alignement des régions conservées entre PepC et différentes protéases à cystéines. Les numéros sont relatifs à la position des acides aminés dans la papaïne (en haut) ou dans PepC (en bas). Les résidus conservés sont entourés. Les résidus du site actif de la papaïne sont indiqués par un astérisque.

papaïne ni avec les autres protéases à cystéine sauf avec une enzyme de mammifère, la bléomycine hydrolase qui présente 34% d'identité avec PepC.

Les gènes *pepN* (van Alen-Boerrigter *et al*, 1991) ou *pepC* (non publié) ont été clonés dans le plasmide pL253 (Simon et Chopin, 1988) qui est un vecteur à haut nombre de copies des lactocoques. L'activité aminopeptidasique peut ainsi être sur-exprimée d'un facteur 20.

DI- ET TRIPEPTIDASES

Deux dipeptidases capables d'hydrolyser une grande variété de dipeptides (exceptés ceux de type Gly-X ou Pro-X) et hydrolysant très mal les tripeptides ont été purifiées. Ce sont des métalloenzymes inhibées par les agents réducteurs des groupements thiol. L'une (DIP II) a été dé-

critée par Hwang *et al* (1981,1982) à partir de *L. lactis* subsp *cremoris* H61 comme étant un dimère de 100 kDa ; l'autre (DIP III) par van Boven *et al* (1988) à partir de *L. lactis* subsp *cremoris* Wg2 comme un monomère de 49 kDa. Des différences ayant été notées dans leur spécificité et cinétique d'hydrolyse, il n'est pas possible d'affirmer qu'il s'agit de la même enzyme. Une autre dipeptidase, n'hydrolysant pas les tripeptides et ayant une préférence pour les dipeptides de type Met-X a aussi été purifiée à partir de *L. lactis* subsp *diacetylactis* CNRZ 267 et caractérisée. C'est une métalloenzyme d'un poids moléculaire de 51 kDa (Desmazeaud et Zevaco, 1977).

Deux tripeptidases de spécificité large mais n'hydrolysant ni les dipeptides, ni les peptides de 4 acides aminés et plus ont été purifiées et caractérisées. Ce sont des métalloenzymes ; l'une (TRP I) d'un poids moléculaire de 75 kDa est isolée de *L. lac-*

tis subsp *diacetylactis* CNRZ 267 (Desmazeaud et Zevaco, 1979), l'autre (TRP II) est un dimère d'un poids moléculaire de 105 kDa, isolé de *L. lactis* subsp *cremoris* Wg2, qui n'est pas capable d'hydrolyser les tripeptides ayant une proline en position centrale (Bosman *et al*, 1990).

PEPTIDASES SPECIFIQUES DES PROLINES

Les caséines, source principale d'azote aminé pour les lactocoques, sont des protéines riches en proline, d'où la nécessité pour ces bactéries de posséder des peptidases spécifiques qui leur permettent de libérer cet acide aminé particulier. Plusieurs enzymes de ce type ont en effet été isolées de lactocoques.

X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase (X-Pro-Y-) ↑

Caractérisation biochimique de l'enzyme

Cette peptidase (PepX) libère des dipeptides X-Pro (et X-Ala mais avec une efficacité catalytique beaucoup plus faible, Lloyd et Pritchard, 1991) à partir de l'extrémité N-terminale de chaînes peptidiques. Elle a été mise en évidence pour de nombreuses souches (Casey et Meyer, 1985; Kiefer-Partsch *et al*, 1989; Zevaco *et al*, 1990; Booth *et al*, 1990b; Lloyd et Pritchard, 1991). Tous les auteurs s'accordent pour dire que c'est une enzyme à sérine de structure dimérique, chaque sous unité ayant un poids moléculaire d'environ 85 kDa. L'intérêt de cette peptidase réside dans le fait qu'elle est tout à fait adaptée à l'hydrolyse des peptides de type X-Pro-Y-Pro-Z-Pro... provenant de la caséine β et libérés par la protéinase de paroi.

Clonage et séquençage du gène

Le gène *pepX* codant pour l'enzyme X-prolyl-dipeptidyl-aminopeptidase, a été le premier gène codant pour une peptidase qui a été isolé, le clonage ayant été réalisé simultanément par Nardi *et al* (1991) et Mayo *et al* (1991), à partir de 2 sous-espèces de *L. lactis*.

Le gène de la souche *L. lactis* subsp *lactis* NCDO 763 a été cloné par complémentation d'un mutant négatif obtenu par mutagenèse à la nitrosoguanidine de la même souche, en utilisant un test d'activité sur colonies (Nardi *et al*, 1991). Ce gène a pu être exprimé chez *Bacillus subtilis*, qui ne possède pas cette activité. Le gène homologue de la souche de *L. lactis* subsp *cremoris* P8-2-47 a également été isolé, dans ce cas en criblant une banque d'ADN chez *E. coli* (Mayo *et al*, 1991). Les deux gènes ont été séquencés; ils contiennent 763 codons et sont identiques à 99 %. La taille de la protéine déduite de la séquence en acides aminés correspond à celle de l'enzyme purifiée (87 kDa). La séquence N-terminale de la protéine purifiée est identique à celle de la séquence nucléotidique déduite du gène, ce qui indique que l'extrémité N-terminale de l'enzyme n'est soumise à aucune maturation. D'après la nature des inhibiteurs de son activité (DFP, PMSF...), l'enzyme apparaît comme une protéase à sérine. Cependant, PepX ne présente aucune homologie de séquence avec les 2 familles de protéases à sérine connues, dont les représentants les mieux étudiés sont la chymotrypsine pour les enzymes d'origine eucaryote et la subtilisine pour celles d'origine procaryote. Ces observations suggèrent que cette enzyme appartient à une nouvelle classe de protéases à sérine.

Comme dans le cas des 2 aminopeptidases PepN et PepC, PepX ne contient pas de séquence correspondant à une séquence signal ou une séquence d'ancrage

membranaire. De telles séquences ont en revanche été précédemment identifiées chez les lactocoques dans le cas de la protéinase localisée dans la paroi, PrtP, et la protéine de maturation de cette protéase, PrtM, qui est une lipoprotéine membranaire.

En clonant le gène *pepX* dans le vecteur pGKV259 (van der Vossen *et al*, 1987), sous la dépendance d'un promoteur fort, l'activité X-prolyl-dipeptidyl-aminopeptidase a été surexprimée d'un facteur 10 (Nardi, communication personnelle).

Prolidase (X-Pro)

Complémentaire de la X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase, une prolidase (PRD) capable d'hydrolyser les dipeptides X-Pro, a été mise en évidence, purifiée et caractérisée chez *L lactis* subsp *cremoris* H61 (Kaminogawa *et al*, 1984) et chez *L lactis* subsp *cremoris* AM2 (Booth *et al*, 1990a). C'est une métalloenzyme de 42 kDa qui n'hydrolyse ni les tripeptides, ni les dipeptides Gly-Pro.

Proline iminopeptidase (Pro-X ou Pro-X-Y)

↑ ↑

Une proline iminopeptidase active sur des di- et tripeptides mais inactive sur des peptides plus longs ainsi que sur Pro-p-nitroanilide a récemment été purifiée de *L lactis* subsp *cremoris* HP (Baankreis et Exterkate, 1991). C'est une métalloenzyme de 110 kDa de structure dimérique. Sa mise en évidence suggère qu'il existe différentes voies de libération de la proline. Booth *et al* (1990a) ont eux aussi, sur une autre souche, mis en évidence l'existence d'une faible activité prolinase sur le substrat Pro-Leu.

ENDOPEPTIDASES

Trois endopeptidases n'hydrolysant pas les protéines et leur préférant des chaînes peptidiques plus courtes ont été décrites chez les lactocoques mésophiles. Ce sont toutes des métalloenzymes et il est possible de les distinguer selon la taille des substrats qu'elles sont capables d'hydrolyser. LEP I (Yan *et al*, 1987b) n'hydrolyse ni les substrats trop courts (5 acides aminés) ni les substrats trop longs (25 acides aminés). LEP II (Yan *et al*, 1987a) et LEP III (Tan *et al*, 1991) sont moins strictes et peuvent hydrolyser à la fois des peptides de 5 acides aminés et des fragments peptidiques allant jusqu'à 3,5 kDa. Des séquences N-terminales différentes pour ces 2 dernières enzymes suggèrent toutefois qu'elles sont différentes. LEP I et LEP II ont été isolées de *L lactis* subsp *cremoris* H61 alors que LEP III l'a été de *L lactis* subsp *cremoris* Wg2. Il serait logique, bien qu'aucune preuve n'en ait encore été apportée qu'une ou plusieurs de ces endopeptidases intervienne dans la dégradation des peptides produits par la protéinase de paroi.

Localisation et rôle dans la nutrition azotée

Les peptides libérés après hydrolyse des caséines par la protéinase associée aux enveloppes sont, en grande majorité, d'une taille supérieure à 5 résidus (Monnet *et al*, 1986, 1989, 1992; Visser, 1988, 1991; Reid *et al*, 1991a et b). Ils doivent donc être hydrolysés préalablement à leur transport à travers la membrane, ce qui implique l'intervention de peptidases exocellulaires. La sécrétion de peptidases dans le milieu de culture n'a pu être mise en évidence chez les lactocoques ; les peptidases extracellulaires doivent donc être

associées aux enveloppes bactériennes. Smid *et al* (1991) ont proposé un modèle dans lequel au moins 3 peptidases exocellulaires seraient nécessaires pour hydrolyser les peptides produits par la protéinase associée aux enveloppes. La caséine β , sous sa forme non micellaire, serait le substrat préférentiel de cette protéase et donc la principale source de peptides pour les lactocoques (Exterkate et de Veer, 1987b). Une aminopeptidase de spécificité large, PepN, libérerait des acides aminés libres (Ser, Thr, Val, Leu, Gln, Ala, Arg, Lys) ainsi que des dipeptides C-terminaux. Cette dernière est cependant incapable de libérer les acides aminés acides et ne coupe pas les liaisons de type X-Pro, aussi son action serait complétée par celle de PepA (qui libère Asp et Glu) et de PepX (qui libère des dipeptides de séquence X-Pro). L'action concertée de ces 3 enzymes serait donc suffisante pour dégrader les peptides produits par la protéinase associée aux enveloppes en acides aminés libres, di-tripeptides et très courts peptides capables d'utiliser les systèmes de transport présents dans la membrane (voir les revues de Konings *et al*, 1989 et 1991, pour la description de ces systèmes de transport). Dans ce schéma, la proline serait transportée essentiellement sous forme de dipeptides X-Pro et ensuite dégradée par la prolidase intracellulaire.

La localisation de plusieurs peptidases a été effectuée par fractionnement cellulaire. Les résultats ne sont toutefois pas toujours convergents et il convient d'être prudent dans leur interprétation car les fractions obtenues se contaminent mutuellement. L'utilisation d'une enzyme intracellulaire marqueur pour suivre la contamination de l'extrait de paroi par le cytoplasme n'est pas toujours un bon critère, cette enzyme pouvant être instable dans les conditions de l'extraction. A titre d'exemple, PepX a été décrite comme exocellulaire par Kiefer-Partsch *et al* (1989) alors que

Zevaco *et al* (1990) ont observé que 97% de l'activité se trouvait dans l'extrait cytoplasmique et seulement 3% dans l'extrait de paroi. La plupart des peptidases décrites ont toutefois été purifiées à partir d'extraits cytoplasmiques (PepX, PepC), de lysats ou de broyats de cellules ce qui suggère une localisation intracellulaire de ces enzymes.

Tan *et al* (1992) ont utilisé la microscopie électronique après marquage à l'or colloïdal pour localiser PepN, PepC, PepX, LEPIII et une tripeptidase. Toutes ces enzymes sont présentes dans le cytoplasme, cependant pour PepX, LEPIII et la tripeptidase un marquage périphérique est également observé. Ce marquage ne permet toutefois pas de dire si ces enzymes sont du côté externe ou du côté interne de la membrane.

Enfin, pour les peptidases dont le gène a été séquencé (PepX, PepN, PepC), il est intéressant de noter qu'aucune séquence signal n'a été observée, ce qui suggère fortement que ces enzymes sont intracellulaires. Leur présence à l'extérieur de la cellule impliquerait en effet l'existence d'un système de translocation à travers la membrane ne faisant pas intervenir de peptide signal. Un tel système a déjà été décrit chez certaines bactéries Gram négatives en particulier dans le cas de la translocation de l'hémolysine (Felmlee *et al*, 1985) mais n'a pas été démontré chez les bactéries Gram positives.

L'ensemble des données sur la localisation n'est donc pas entièrement compatible avec le modèle de Smid *et al* (1991) décrit précédemment, puisqu'au moins PepN et PepX semblent être intracellulaires. Plusieurs hypothèses alternatives peuvent être avancées. L'une est que les peptidases exocellulaires n'ont pas encore été mises en évidence, parce qu'elles sont particulièrement instables et ne résistent pas aux conditions d'extraction employées,

ou parce qu'elles ne sont pas actives sur les substrats synthétiques généralement utilisés. Une autre hypothèse remet en cause l'existence de peptidases exocellulaires, la bactérie utiliserait alors uniquement les courts peptides (inférieurs à 5 résidus) produits par la protéinase associée aux enveloppes. Ces courts peptides sont toutefois peu abondants et il est probable qu'ils puissent apporter les acides aminés indispensables en quantité suffisante. Dans une dernière hypothèse, la lyse d'une faible proportion des cellules serait à l'origine de la libération d'une activité exopeptidasique dans le milieu de culture. Cette activité hydrolyserait les peptides produits par la protéinase associée aux enveloppes. Il faut cependant noter que les dosages d'activités peptidasiques dans le milieu de culture au cours de la croissance n'ont pas permis de révéler cette libération.

Comme on le voit, aucune des hypothèses présentées n'est vraiment démontrée et des études sont encore nécessaires pour obtenir une vision claire du mécanisme de la nutrition azotée des lactocoques.

REFERENCES

- Baankreis R, Exterkate FA (1991) Characterisation of a peptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* HP that hydrolyses dipeptides and tripeptides containing proline or hydrophobic residues as the aminoterminal amino acid. *Syst Appl Microbiol* 14, 317-323
- Booth M, Donnelly WJ, Fhaolain IN, Jennings PV, O'Cuinn G (1990a) Proline-specific peptidases of *Streptococcus cremoris* AM2. *J Dairy Res* 57, 79-88
- Booth M, Fhaolain IN, Jennings PV, O'Cuinn G (1990b) Purification and characterization of a post-proline dipeptidyl aminopeptidase from *Streptococcus cremoris* AM2. *J Dairy Res* 57, 89-99
- Bosman BW, Tan PST, Konings WN (1990) Purification and characterization of a tripeptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. *Appl Environ Microbiol* 56, 1839-1843
- Casey MG, Meyer J (1985) Presence of X-prolyl-dipeptidyl-peptidase in lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* 68, 3212-3215
- Chapot-Chartier MP, Nardi M, Chopin MC, Chopin A, Gripon JC (1993) Cloning and sequencing of *pepC*, a cysteine aminopeptidase gene from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2. *Appl Environ Microbiol* 59, 330-333
- Cliffe AJ, Law BA (1979) An electrophoretic study of peptidases in starter streptococci and in Cheddar cheese. *J Appl Bacteriol* 47, 65-73
- Desmazeaud MJ, Zevaco C (1977) General properties and substrate specificity of an intracellular soluble dipeptidase from *Streptococcus diacetylactis*. *Ann Biol Anim Biochim Biophys* 17, 723-736
- Desmazeaud MJ, Zevaco C (1979) Isolation and general properties of two intracellular aminopeptidases of *Streptococcus diacetylactis*. *Milchwissenschaft* 34,606-610
- Exterkate FA, de Veer GJCM (1987a) Purification and some properties of a membrane-bound aminopeptidase A from *Streptococcus cremoris*. *Appl Environ Microbiol* 53, 577-583
- Exterkate FA, de Veer GJCM (1987b) Optimal growth of *Streptococcus cremoris* HP in milk is related to β - and κ - degradation. *Appl Microbiol Biotechnol* 25, 471-475
- Felmler T, Pellett S, Lee EY, Welch RA (1985) *Escherichia coli* hemolysin is released extracellularly without cleavage of a signal peptide. *J Bacteriol* 163, 88-93
- Geis A, Bockelmann W, Teuber M (1985) Simultaneous extraction and purification of a cell wall-associated peptidase and β -casein specific protease from *Streptococcus cremoris* AC1. *Appl Microbiol Biotechnol* 23, 79-84
- Hwang I, Kaminogawa S, Yamauchi K (1981) Purification and properties of a dipeptidase from *Streptococcus cremoris*. *Agric Biol Chem* 45, 159-165
- Hwang I, Kaminogawa S, Yamauchi K (1982) Kinetic properties of a dipeptidase from *Streptococcus cremoris*. *Agric Biol Chem* 46, 3049-3053
- Kaminogawa S, Ninomiya T, Yamauchi K (1984) Aminopeptidase profiles of lactic streptococci. *J Dairy Sci* 67, 2483-2492

- Kiefer-Partsch B, Bockelmann W, Geis A, Teuber M (1989) Purification of an X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from the cell wall proteolytic system of *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*. *Appl Microbiol Biotechnol* 31, 75-78
- Kok J, Venema G (1988) Genetics of proteinases of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70,475-488
- Konings WN, Poolman, B, Driessen AJM (1989) Bioenergetics and solute transport in lactococci. *CRC Crit Rev Microbiol* 16, 419-476
- Konings WN, Smid EJ, Laan H, Driessen AJM (1991) From casein to cheese : the role of *Lactococcus lactis*. *Food Biotechnol* 5, 263-277
- Law BA (1979) Extracellular peptidases in group N streptococci used as cheese starters. *J Appl Bacteriol* 46, 455-463
- Lloyd RJ, Pritchard GG (1991) Characterization of X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp *lactis*. *J Gen Microbiol* 137, 49-55
- Mayo B, Kok J, Venema K, Bockelmann W, Teuber M, Renke H, Venema G (1991). Molecular cloning and sequence analysis of the X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase gene from *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*. *Appl Environ Microbiol* 57, 38-44
- Monnet V, Le Bars D, Gripon JC (1986) Specificity of a cell wall proteinase from *Streptococcus lactis* NCDO 763 towards bovine β -casein. *FEMS Microbiol Lett* 36, 127-131
- Monnet V, Bockelmann W, Gripon JC, Teuber M (1989) Comparison of cell wall proteinases from *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* AC1 and *Lactococcus lactis* subsp *lactis* NCDO 763. II. Specificity towards bovine β -casein. *Appl Microbiol Biotechnol* 31, 112-118
- Monnet V, Ley JP, Gonzalez S (1992) Substrate specificity of the cell envelope-located proteinase of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* NCDO-763. *Int J Biochem* 24, 707-718
- Mou L, Sullivan JJ, Jago GR (1975) Peptidase activities in group N streptococci. *J Dairy Res* 42, 147-155
- Nardi M, Chopin MC, Chopin A, Cals MM, Gripon JC (1991) Cloning and DNA sequence analysis of an X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* AM2. *Appl Environ Microbiol* 57, 2308-2314
- Neviani E, Boquien CY, Monnet V, Phan Thanh L, Gripon JC (1989) Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* AM2. *Appl Environ Microbiol* 55, 2308-2314
- Niven GW (1991) Purification and characterization of aminopeptidase A from *Lactococcus lactis* subsp *lactis* NCDO 712. *J Gen Microbiol* 137, 1207-1212
- Reid JR, Moore CH, Midwinter GG, Pritchard GG (1991a) Action of a cell wall proteinase from *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* SK11 on bovine α s1-casein. *Appl Microbiol Biotechnol* 35, 222-227
- Reid JR, Ng KH, Moore CH, Coolbear T, Pritchard GG (1991b) Comparison of bovine β -casein hydrolysis by PI and PIII type proteinases from *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*. *Appl Microbiol Biotechnol* 36,344-351
- Schmidt RH, Morris HA, McKay LL (1977) Cellular location and characteristics of peptidase enzymes in lactic streptococci. *J Dairy Sci* 60, 710-717
- Simon, D, Chopin, A (1988) Construction of a vector plasmid family and its use for molecular cloning in *Streptococcus lactis*. *Biochimie* 70, 559-566
- Smid EJ, Poolman B, Konings WN (1991) Casein utilization by lactococci. *Appl Environ Microbiol* 57, 2447-2452
- Stroman P (1992) Sequence of a gene (lap) encoding a 95.3-kDa aminopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* Wg2. *Gene* 113, 107-112
- Tan PST, Konings WN (1990) Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* Wg2. *Appl Environ Microbiol* 56, 526-532
- Tan PST, Pos KM, Konings WN (1991) Purification and characterization of an endopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* Wg2. *Appl Environ Microbiol* 57, 3593-3599
- Tan PST, Chapot-Chartier MP, Pos KM, Rousseau M, Boquien CY, Gripon JC, Konings WN (1992) Localization of peptidases in lactococci. *Appl Environ Microbiol* 58, 285-290
- Tan PST, van Alen-Boerrigter IJ, Poolman B, Siezen RJ, de Vos WM, Konings WN Characterization of the *Lactococcus lactis* pepN gene encoding an aminopeptidase homolo-

- gous to mammalian aminopeptidase N. Soumis pour publication
- Thomas TD, Mills OE (1981) Proteolytic enzymes of starter bacteria. *Neth Milk Dairy J* 35, 255-273
- Thomas TD, Pritchard GG (1987) Proteolytic enzymes of dairy starter cultures. *FEMS Microbiol Rev* 46, 245-268
- van Alen-Boerrigter IJ, Baankreis R, de Vos WM (1991) Characterization and overexpression of the *Lactococcus lactis pepN* gene and localization of its product, aminopeptidase N. *Appl Environ Microbiol* 57, 2555-2561
- van Boven A, Tan PST, Konings WN (1988) Purification and characterization of a dipeptidase from *Streptococcus cremoris* Wg2. *Appl Environ Microbiol* 54, 43-49
- van der Vossen JMBM, van der Lelie D, Venema G (1987). Isolation and characterization of *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* Wg2-specific promoters. *Appl Environ Microbiol* 53, 2452-2457
- Visser S, Exterkate FA, Slangen CJ, de Veer GJCM (1988) Action of a cell wall proteinase (PI) from *Streptococcus cremoris* HP on bovine β -casein. *Appl Microbiol Biotechnol* 29, 61-66
- Visser S, Robbes AJPM, Slangen CJ (1991) Specificity of a cell-envelope-located proteinase (PIII type) from *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* am1 in its action on bovine β -casein. *Appl Microbiol Biotechnol* 35, 477-483
- Yan TR, Azuma S, Kaminogawa S, Yamauchi K (1987a) Purification and characterization of a novel metalloendopeptidase from *Streptococcus cremoris* H61. *Eur J Biochem* 163, 259-265
- Yan TR, Azuma N, Kaminogawa S, Yamauchi K (1987b) Purification and characterization of a substrate-size-recognizing metalloendopeptidase from *Streptococcus cremoris* H61. *Appl Environ Microbiol* 53, 2296-2302
- Zevaco C, Monnet V, Gripon JC (1990) Intracellular X-prolyl dipeptidyl peptidase from *Lactococcus lactis* subsp *lactis* - purification and properties. *J Appl Bacteriol* 68, 357-366